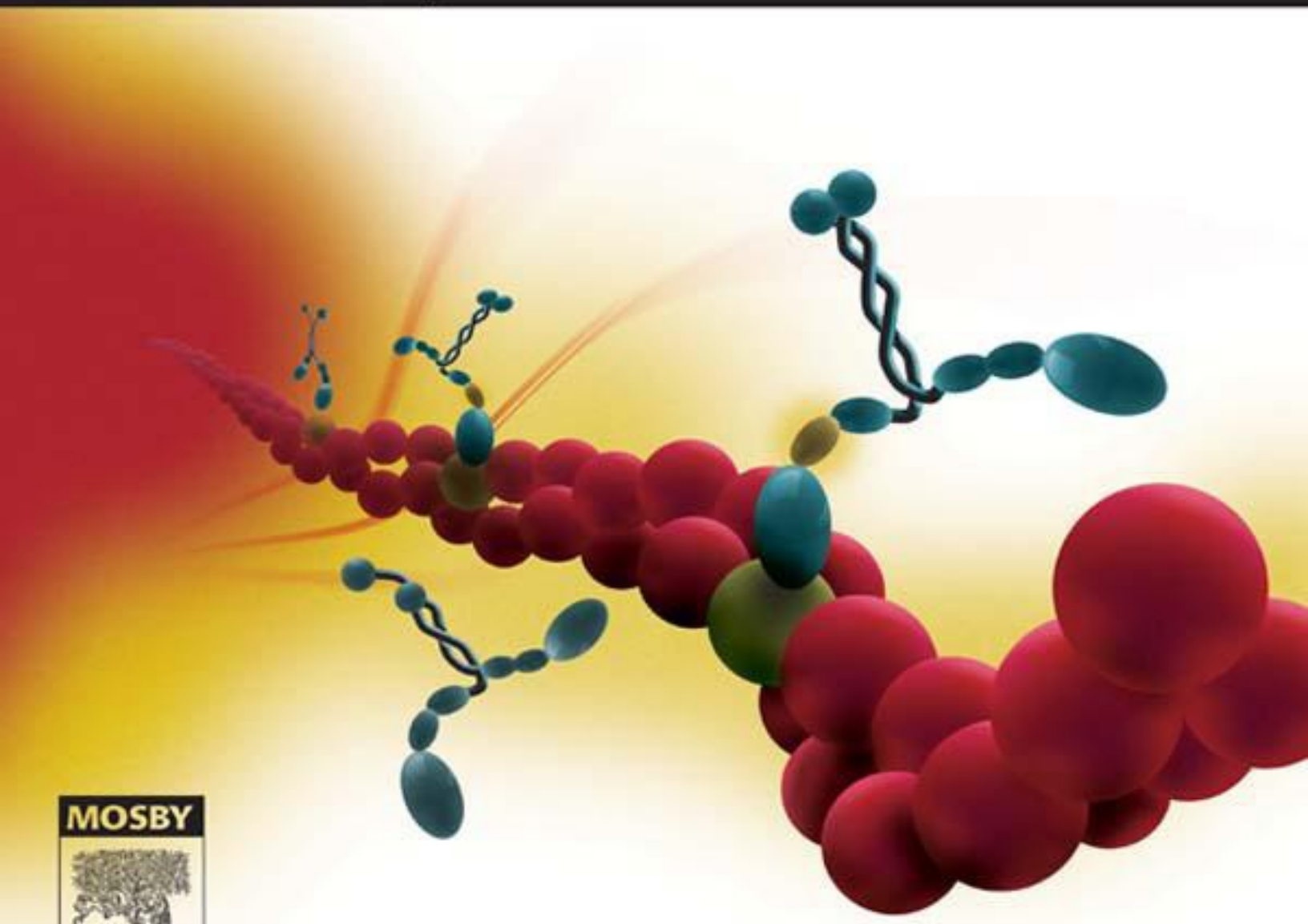
BIOQUÍMICA MÉDICA

acesso on-line
RECURSOS INTERATIVOS EXTRAS
STUDENT CONSULT
studentconsult.com.br

John W. Baynes • Marek H. Dominiczak



MOSBY
ELSEVIER

TRADUÇÃO DA 3ª EDIÇÃO

BIOQUÍMICA MÉDICA

TERCEIRA EDIÇÃO

John W Baynes, PhD
Carolina Distinguished Professor Emeritus, Department of Chemistry and Biochemistry, Graduate Science Research Center, University of South Carolina, Columbia, South Carolina, USA

Marek H Dominiczak, MD FRCPath FRCP(Glas)
Professor in the Medical Faculty, University of Glasgow

Consultant Biochemist, NHS Greater Glasgow and Clyde, Gartnavel General Hospital, Glasgow, UK

MOSBY

Front Matter

BIOQUÍMICA MÉDICA

TERCEIRA EDIÇÃO

John W Baynes PhD
Carolina Distinguished Professor Emeritus
Department of Chemistry and Biochemistry
Graduate Science Research Center
University of South Carolina
Columbia, South Carolina
USA
Marek H Dominiczak MD FRCPath FRCP(Glas)
Professor in the Medical Faculty
University of Glasgow
Consultant Biochemist
NHS Greater Glasgow and Clyde
Gartnavel General Hospital
Glasgow
UK



Copyright

Do original: Medical Biochemistry, Third edition
© 1999, 2005 por Elsevier Limited
Tradução autorizada do idioma inglês da edição publicada por Mosby – um selo editorial Elsevier Inc.
ISBN: 978-0-323-05371-6
© 2011 Elsevier Editora Ltda.
Todos os direitos reservados e protegidos pela Lei 9.610 de 19/02/1998.
Nenhuma parte deste livro, sem autorização prévia por escrito da editora, poderá ser reproduzida ou transmitida sejam quais forem os meios empregados: eletrônicos, mecânicos, fotográficos, gravação ou quaisquer outros.
ISBN: 978-85-352-3561-6
Capa
Interface/Sergio Liuzzi
Editoração Eletrônica
Futura Assessoria e Serviços Ltda.
Elsevier Editora Ltda.
Conhecimento sem Fronteiras
Rua Sete de Setembro, n° 111 – 16° andar
20050-006 – Centro – Rio de Janeiro – RJ
Rua Quintana, n° 753 – 8° andar
04569-011 – Brooklin – São Paulo – SP
Serviço de Atendimento ao Cliente
0800 026 53 40
sac@elsevier.com.br
Preencha a ficha de cadastro no final deste livro e receba gratuitamente informações sobre os lançamentos e promoções da Elsevier.
Consulte também nosso catálogo completo, os últimos lançamentos e os serviços exclusivos no site www.elsevier.com.br

NOTA

O conhecimento médico está em permanente mudança. Os cuidados normais de segurança devem ser seguidos, mas, como as novas pesquisas e a experiência clínica ampliam nosso conhecimento, alterações no tratamento e terapia à base de fármacos podem ser necessárias ou apropriadas. Os leitores são aconselhados a checar informações mais atuais dos produtos, fornecidas pelos fabricantes de cada fármaco a

ser administrado, para verificar a dose recomendada, o método e a duração da administração e as contraindicações. É responsabilidade do médico, com base na experiência e contando com o conhecimento do paciente, determinar as dosagens e o melhor tratamento para cada um individualmente. Nem o editor nem o autor assumem qualquer responsabilidade por eventual dano ou perda a pessoas ou a propriedade originada por esta publicação.

O Editor

CIP-BRASIL. CATALOGAÇÃO-NA-FONTE
SINDICATO NACIONAL DOS EDITORES DE LIVROS, RJ



B347b
Baynes, John
Bioquímica médica/John W. Baynes e Marek H. Dominiczak; [tradução de Jacyara Maria
Brito Macedo… et al.]. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2010.
il.
Tradução de: Medical biochemistry, 3rd ed
Apĕndice
Inclui bibliografi a e índice
ISBN 978-85-352-3561-6
1. Bioquímica clínica. I. Dominiczak, Marek H. II. Título.
09-4970.
CDD: 612.015
CDU: 612.015

Prefácio-

Temos o prazer de apresentar a terceira edição de *Bioquímica Médica*. Tem sido uma gratificação ver os textos das edições anteriores serem adotados em um número cada vez maior de universidades pelo mundo. Na terceira edição, nossas metas permanecem as mesmas: proporcionar uma base para o estudo da medicina clínica – com a máxima relevância prática. O objetivo é ajudar a moldar um clínico cientificamente informado.

A terceira edição foi mais uma vez amplamente atualizada. Os capítulos sobre lipídios, bioquímica endócrina e homeostase da glicose foram reescritos e os sobre regulação da expressão gênica e tecnologia do DNA recombinante foram atualizados para incluir os recentes avanços nestes campos que estão em rápida evolução. Também recrutamos vários novos autores para proporcionar uma nova perspectiva na cobertura de alguns tópicos complexos como biossíntese de proteínas e de nucleotídeos, DNA e RNA. Adicionamos um novo capítulo sobre sistemas bioquímicos, as "ômicas": genômica, proteômica e metabolômica, para complementar capítulos que já existem sobre biotecnologia e expressão gênica. Todos os capítulos foram revisados com ênfase na clareza da apresentação. Fomos também incisivos em remover assuntos redundantes ou desatualizados. As referências da literatura foram completamente atualizadas e existem agora muito mais referências nos sites relevantes. Nesta edição, retiramos o Banco de Questões (Autoavaliação), porque esse recurso e muitos outros estão disponíveis no site da Elsevier: www.studentconsult.com, para o qual o leitor é direcionado para consulta.*

Incluímos muitas referências cruzadas novas: as quais levam o leitor a assuntos relacionados e casos clínicos, em diferentes capítulos do livro. Dessa forma, os Quadros Clínicos, de Exames Clínicos ou de Conceitos Avançados complementam o texto em diferentes capítulos. Lembrar, entretanto, que o uso dessas referências cruzadas é opcional: cada capítulo é uma história independente.

Nesta edição o leitor verá maior ênfase nos sistemas de sinalização e cascatas de reações de regulação. Centralizamos nessas vias complexas porque a regulação da transdução de sinal promove um potencial enorme para o desenvolvimento de novas terapias. Uma palavra de atenção: em breve o leitor notará que a terminologia na expressão gênica e sinalização é muitas vezes difícil para não especialistas (bem como para o especialista!). Muitos nomes de genes e fatores de transcrição são enigmáticos, na melhor das hipóteses. Os que temos aqui incluídos não são para serem memorizados, mas para proporcionar uma imagem coerente e um modelo baseado em fatos para outros sistemas biológicos reguladores.

A força desse livro é que ele reúne (esperamos alegremente) aspectos da bioquímica "convencional" com uma quantidade substancial de biologia molecular. Nosso julgamento sobre a quantidade incluída de cada um foi impulsionado pelo pragmatismo: a relevância de determinado tema para a prática da medicina de hoje.

O texto aborda diversas interfaces interdisciplinares, sendo a mais importante entre a bioquímica e biologia molecular. Existem outras: os capítulos sobre água e metabolismo de eletrólitos e sobre equilíbrio acidobásico, no tradicional ensino associado à fisiologia. Acreditamos, entretanto, que eles são essenciais para o entendimento da bioquímica na medicina. Incluímos também uma quantidade substancial de bioquímica "diagnóstica" (clínica), a qual ilumina a interpretação de testes comumente usados na prática clínica. Isso não faz apenas o livro mais valioso para um estudante de medicina, mas estende sua utilidade ou para aqueles com base médica ou científica, que pretendam prosseguir uma carreira em medicina laboratorial.

Esperamos que o livro ofereça ao leitor uma ampla perspectiva em bioquímica e em seu potencial futuro. Se isso for alcançado, é porque nossos colaboradores representam um grupo amplo com muitos conhecimentos – incluindo pesquisadores envolvidos em pesquisa básica de vanguarda, tanto quanto clínicos experientes, que gastam a maior parte do seu tempo em enfermarias e ambulatórios. Portanto, acreditamos que uma avaliação clássica de um livro de bioquímica médica não se aplica aqui: este não é um livro no qual médicos teorizam sobre a ciência, ou cientistas, sobre a prática clínica, é um trabalho integrado que realmente combina pesquisa e prática.

Esperamos que esta seja uma agradável leitura. Estamos ansiosos para ouvir seus comentários e sugestões.

- Nota do Editor: As perguntas e respostas também estão disponíveis em português no www.studentconsult.com.br.

Colaboradores

Gary A. Bannon, PhD, Director, Section on Protein Analytics, Regulatory Division, Monsanto, St Louis, MO, USA

John W. Baynes, PhD, Carolina Distinguished Professor Emeritus, Department of Chemistry and Biochemistry, Graduate Science Research Center, University of South Carolina, Columbia, SC, USA

Robert Best, PhD, Professor, Division of Medical Genetics, School of Medicine, University of South Carolina, Columbia, SC, USA

Franklyn F. Bolander, Jr., MD PhD, Associate Professor in Biological Sciences, Department of Biological Sciences, University of South Carolina, Columbia, SC, USA

Iain Broom, MBChB MIBiol FRCPath FRCP, Professor of Clinical Biochemistry; Consultant in Clinical, Biochemistry and Metabolic Medicine, The Robert Gordon University, School of Life Sciences, Aberdeen, UK

James A. Carson, PhD, Associate Professor, Department of Exercise Science, University of Southern Carolina, Columbia, SC, USA

Wayne M. Carver, PhD, Associate Professor, Department of Cell and Developmental Biology and Anatomy, University of South Carolina, School of Medicine, Columbia, SC, USA

Marek H. Dominiczak, MD FRCPath FRCP(Glas), Professor in the Medical Faculty, University of Glasgow;, Consultant Biochemist, cNHS Greater Glasgow and Clyde, Gartnavel General Hospital, Glasgow, UK

Alan D. Elbein, PhD, Professor and Chair, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, AR, USA

Alex Farrell, FRCPath (deceased), Formerly Consultant Immunologist; Head of Department of Clinical Immunology, Immunopathology, Histocompatibility and Immunogenetics, Western Infirmary, Glasgow, UK

William D. Fraser, BSc MD MRCP FRCPath, Professor of Clinical Biochemistry, Department of Clinical Chemistry, Royal Liverpool University Hospital, Liverpool, UK

Junichi Fujii, PhD, Professor, Department of Biomolecular Function, Graduate School of Medical Science, Yamagata University, Yamagata, Japan

Peter J. Galloway, DCH FRCP (Edin) FRCPath, Consultant Chemical Pathologist, NHS Greater Glasgow and Clyde, Yorkhill Hospital for Sick Children, Glasgow, UK

Helen S. Goodridge, BSc PhD, Research Scientist, Immunobiology Research Institute, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA, USA

J Alastair Gracie, BSc PhD, Senior University Teacher, Division of Immunology, Infection and Inflammation, Glasgow Biomedical Research Centre, University of Glasgow, Glasgow, UK

Alejandro Gugliucci, MD PhD, Professor of Biochemistry, Touro University, Vallejo, CA, USA

Margaret M. Harnett, BSc PhD, Professor of Immune Signalling, Division of Immunology, Infection and Inflammation, Glasgow Biomedical Research Centre, University of Glasgow, Glasgow, UK

Simon Heales, PhD FRCPath, Consultant Clinical Scientist, Department of Clinical Biochemistry, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London, UK

George M. Helmkamp, Jr., PhD, Professor of Biochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Kansas School of Medicine, Kansas City, KS, USA

D Margaret Hunt, BA PhD, Associate Professor, Department of Pathology and Microbiology, University of South Carolina School of Medicine, Columbia, SC, USA

Andrew Jamieson, MBChB(Hons) PhD FRCP(Glas), Consultant Physician, Department of Medicine, Hairmyres Hospital, East Kilbride, UK

Alan F. Jones, DPhil FRCP FRCPath, Consultant Physician and Chemical Pathologist, Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Birmingham Heartlands and Solihull NHS Trust, Birmingham, UK

Gur Prasad Kaushal, PhD, Professor of Medicine, Department of Medicine, Division of Nephrology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, AR, USA

W Stephen Kistler, PhD, Professor of Biochemistry, Department of Chemistry, University of South Carolina, Columbia, SC, USA

Walter Kolch, MD DR MED HAB, Professor of Molecular Cell Biology, Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, UK

Utkarsh V. Kulkarni, MBBS MD MRCP DipRCPath, Senior Research Fellow, Centre for Obesity Research and Epidemiology, The Robert Gordon University, Aberdeen, UK

Gordon Lowe, MD FRCP, Professor of Vascular Medicine, Division of Cardiovascular Medical

Sciences, University of Glasgow, Royal Infirmary, Glasgow, UK

Masatomo Maeda, PhD, Professor of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan

Jeffrey R. Patton, PhD, Associate Professor, Department of Pathology, Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of South Carolina, Columbia, SC, USA

Andrew Pitt, BSc DPhil, Director, Sir Henry Wellcome Functional Genomics Facility;, Senior Lecturer, Department of Integrative and Systems Biology, University of Glasgow, Glasgow, UK

Allen B. Rawitch, PhD, Professor of Biochemistry and Molecular Biology, Office of Academic Affairs, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS, USA

Peter F. Semple, MD FRCP, Senior Lecturer; Consultant Physician, Department of Medicine and Therapeutics, University of Glasgow, Western Infirmary, Glasgow, UK

Robert K. Semple, PhD MRCP, Wellcome Trust Clinician Scientist Fellow, Department of Clinical Biochemistry, Cambridge University, Cambridge, UK

L William Stillway, PhD, Professor of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical University of Southern Carolina, Charleston, SC, USA

Mirosława Szczepaùska-Konkel, PhD, Professor of Clinical Biochemistry, Laboratory of Cellular and Molecular Nephrology, Polish Academy of Sciences Medical Research Centre, Medical School of Gdansk, Gdansk, Poland

Naoyuki Taniguchi, MD PhD, Professor, Department of Biochemistry, Osaka University Medical School, Osaka, Japan

Yee Ping Teoh, MBDS MRCP DipRCPath, Consultant Chemical Pathologist, Department of Medical Biochemistry, Wrexham Maelor Hospital, Wrexham, UK

Edward J. Thompson, PhD MD DSc FRCPath FRCP, Professor of Neurochemistry, Department of Neuroimmunology, Institute of Neurology, National Hospital for Nervous Diseases, London, UK

Robert Thornburg, PhD, Professor of Biochemistry, Department of Biochemistry, Biophysics and Molecular, Biology, Iowa State University, Ames, IA, USA

A Michael Wallace, BSc MSc PhD FRCPath, Professor, University of Strathclyde, Consultant Clinical Scientist, Department of Clinical Biochemistry, Royal Infirmary, Glasgow,

UKContributorsColaboradores

Dedicatória

John Baynes

A todos os coautores, que têm contribuído com suas experiências e orientações à bioquímica médica

Marek Dominiczak

A meus professores, H. Gemmel Morgan e Stefan Angielski

A Anna, meus pais e Peter Jacob

A meus alunos e estagiários

A todos que moldarão o futuro da bioquímica

Agradecimentos

Agradecemos os colaboradores desta edição por seus esforços e conhecimentos técnicos e por lidar com os muitos pedidos dos editores. Agradecemos os novos colaboradores desta edição: Wayne Carver, Alistair Gracie, Alejandro Gugliucci, Walter Kolch, Utkarsh Kulkarni, Jeffrey Patton e Yee Ping Teoh. Novamente agradecemos Peter Semple, pela verificação dos quadros clínicos, e Peter Galloway, pela revisão e contribuição com muitos casos pediátricos para a segunda edição. Ficamos muito tristes com a morte prematura de Alex Farrell, que escreveu o capítulo original sobre o sistema imune.

Agradecemos nossos estudantes por seus comentários, os quais partilham conosco nos laboratórios de ensino, em palestras e tutoriais, e pelas revisões, sugestões e críticas postadas na internet. Também estamos em falta com muitos médicos e enfermeiros com os quais nos encontramos nas visitas às enfermarias, especialmente os membros da equipe de nutrição, em Glasgow, onde discussões multidisciplinares canalizaram conhecimentos em diferentes áreas para assistência ao paciente.

Agradecemos a equipe da Elsevier – Alex Stibbe, Kate Dimock, Nani Clansey e Kerrie-Anne McKinlay – que habilmente orientou esta edição desde a ideia inicial, por meio da escrita e provas, até a publicação. Somos gratos aos artistas, pelos seus persistentes esforços na preparação das ilustrações, e aos revisores Anne Powell e Punella Theakes, pelo rigor. Tal como antes, apreciamos muito o inestimável apoio de secretariado da Sra. Jacky Gardiner, em Glasgow.

Abreviaturas

A adenina
Å ângstrom (medida de comprimento)
AADC aminoácido aromático descarboxilase periférica
ABC região no transportador que liga ATP (*ATP binding cassete*)
ABP proteína de ligação de androgênios
AC anidrase carbônica
Ac adenilato ciclase [Ca]
ACAT accilcolesterol aciltransferase
ACE enzima conversora de angiotensina [ECA]
Acetil-CoA acetilcoenzima A
ACh acetilcolina
ACP proteína carreadora de acil
ACTase aspartato carbamiltransferase
ACTH hormônio adrenocorticotrópico
ADAR adenosina desaminase que atua sobre o RNA
ADC complexo da demência ligada à AIDS
ADH álcool desidrogenase
ADH hormônio antidiurético (também conhecido como AVP)
ADP difosfato de adenosina
AFP alfafetoproteína [αFP]
AG ácidos graxos
AGE ácidos graxos essenciais
AGE produto final de glicosilação avançada
AGL ácidos graxos livres
AHF fator anti-hemofílico
AICAR 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo
AIDS síndrome da imunodeficiência adquirida [SIDA]
AINES anti-inflamatório não esteroidal [NSAID]
AIR 5-aminoimidazol ribonucleotídeo
ALDH aldeído desidrogenase
ALE produto final de lipoxidação avançada
ALL leucemia linfoblástica aguda
ALP fosfatase alcalina [FA]
ALT alanina aminotransferase

AMD degeneração macular relacionada à idade
AMG gene da amelogenina
AML leucemia mieloblástica aguda [LMA]
AMP monofosfato de adenosina
AP-1 proteína ativadora 1
APC célula apresentadora de antígeno
APO-1 receptor Fas do domínio da morte
apoA, B etc. apoproteína A, B etc.
APRT adenosina fosforribosil transferase
APTT tempo de tromboplastina parcialmente ativada [TPTA]
ARDS síndrome da insuficiência respiratória aguda [SARA]
ASO oligonucleotídeo alelo-específico
AST aspartato aminotransferase [TGO]
ATCase aspartato transcarbamilase
ATF fator de ativação da transcrição
ATM gene mutado da ataxia telangiectasia
ATP trifosfato de adenosina
ATPase enzima que hidrolisa o ATP
AVP argininovasopressina (igual a hormônio antidiurético)
AZT 3′-azido-3′-desoxitimidina
2,3-BPG 2,3-bifosfoglicerato
BAC cromossomo bacteriano artificial
***Bcl*-2** proteína 2 de linfoma de célula B
BCR região de quebra (*breakpoint cluster region*)
BH_4 tetraidrobiopterina
bp par de bases
BrdU bromodesoxiuridina
BUN nitrogênio ureico, equivalente à ureia (não é sinônimo)
bw peso corporal
C citosina
CA anidrase carbônica [AC]
Ca adenilato ciclase [Ac]
CAD endonuclease dependente de caspase
CAIR carboxiaminoimidazol ribonucleotídeo
CAM calmodulina
cAMP AMP cíclico (AMPc)
CaSR receptor sensível ao cálcio

CAT catalase
CBG globulina de ligação de corticosteroides
CCVD canais de cálcio voltagem-dependente (ou dependentes de voltagem) [VDCC]
CD designação de *cluster*: sistema de classificação para moléculas de superfície celular
CDGS síndromes da glicoproteína deficiente em carboidrato
CDK cinase dependente de ciclina
CDKI inibidor da cinase dependente de ciclina
cDNA DNA complementar a um mRNA
CDP difosfato de citidina
CERP proteína reguladora do efluxo de colesterol
CETP proteína de transferência de éster de colesterol
CFDA SE diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster não fluorescente
CFTR regulador da condutância transmembrana da fibrose cística
cGMP GMP cíclico (GMPc)
CGRP peptídio relacionado com o gene da calcitonina
CID ou CIVD coagulação intravascular disseminada [DIC]
cit citocromo
CITP peptídeo de extensão do terminal carboxílico do pró-colágeno
CK ou CPK creatina cinase
CML leucemia mieloide crônica [LMC]
CML(V) células musculares lisas (vasculares)
CMP monofosfato de citidina
CNS sistema nervoso central [SNC]
CNV variação de número de cópias
CoA coenzima A
COAD ou COPD doença pulmonar obstrutiva crônica [DPOC]
CODIS sistema combinado de índices de DNA
COMT catecol-*O*-metiltransferase
CoQ_{10} coenzima Q_{10} (ubiquinona)
COX-1 ciclo-oxigenase-1
CPD complexo piruvato desidrogenase
CPI ilha de CpG
CPK ou CK creatina fosfocinase
CPS I, II carbamoil fosfato sintetase I, II
CPT I, II carnitina palmitiltransferase I, II
CRBP proteína citosólica de ligação de retinal

CRE elemento de resposta ao AMP cíclico
CREB proteína de ligação do elemento responsivo ao AMP cíclico
CRGP gene do peptídeo relacionado à calcitonina
CRH hormônio de liberação de corticotropina
CRP proteína C-reativa
CS citrato sintase
CSF líquido cerebroespinhal [LCR]
CSF-1 fator estimulante de colônia 1
CT calcitonina
CTP trifosfato de citidina
CTX telopeptídeo carboxiterminal do colágeno
CVS biópsia de vilosidade coriônica
CVS célula vermelha do sangue [RBC]
Da (Dalton) unidade de massa molecular dos aminoácidos
DAG diacilglicerol
DAPI 4′-6′-diamidino-fenilindol-2HCl
dATP trifosfato de desoxiadenosina
DBP proteína de ligação da vitamina D
DCC gene de "deleção no carcinoma de cólon"
ddATP trifosfato de didesoxiadenosina
DDC 2′-3′-didesoxicitidina
ddCTP trifosfato de didesoxicitidina
ddGTP trifosfato de didesoxiguanosina
ddNTP trifosfato de didesoxirribonucleosídeo
ddTTP trifosfato de didesoxitimidina
DEAE dietilaminoetil
DEXA absortometria de energia dupla de raios X
DGGE eletroforese em gel com gradiente de desnaturante
DHAP fosfato de di-hidroacetona
DHFR di-hidrofolato redutase
DHPR di-hidrobiopterina redutase
DHT di-hidrotestosterona
DIC coagulação intravascular disseminada [CID ou CIVD]
DIPF diisopropilfosfofluoreto
DMID diabetes melito insulino-dependente
DMNID diabetes melito não insulino-dependente [NIDDM]
DNA ácido desoxirribonucleico

DNP 2,4-dinitrofenol
dNTP desoxirribonucleotídeo trifosfato
Dol-P dolicol fosfato
Dol-PP-GlcNAc dolicol pirofosfato-*N*-acetilglicosamina
DOPA di-hidroxifenilalanina
DPOC doença pulmonar obstrutiva crônica [COAD ou COPD]
DPPC dipalmitilfosfatidilcolina
DRPLA atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana
dsRNA RNA de dupla fita
DVT trombose venosa profunda
EBV vírus Epstein-Barr
ECA enzima conversora de angiotensina [ACE]
ECF líquido extracelular [LEC]
ECM matriz extracelular [MEC]
EDRF fator de relaxamento derivado do endotélio (N0)
EDTA ácido etilenodiaminotetracético
EF-1,2 fator de alongamento da tradução
EF2 fator de alongamento de célula eucariótica
EGF fator de crescimento epidérmico
eIF-3 fator de iniciação da tradução de célula eucariótica(-3)
ELK tipo de fator de transcrição
EM espectrometria de massa [MS]
EMSA ensaio de mudança de mobilidade eletroforética
eNOS óxido nítrico sintase endotelial
EPA ácido eicosapentaenoico
EPO eritropoetina
ER retículo endoplasmático [RE]
ERK cinase regulada extracelularmente
ERN espécies reativas do nitrogênio [RNS]
ERO espécies reativas do oxigênio [ROS]
ESI MS espectrometria de massa com ionização tipo *electrospray*
ESR taxa de sedimentação de eritrócitos (glóbulos vermelhos)
FACIT colágeno associado à fibrila com triplas hélices interrompidas
FAD flavina adenina dinucleotídeo
FADD proteína acessória do "domínio da morte"
$FADH_2$ flavina adenina dinucleotídeo reduzido
FAICAR 5-formoilaminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo

FAP polipose adenomatosa familiar [PAF]
Fas molécula de sinalização da apoptose: proteína acessória do "domínio da morte" (CD95)
F-ATPase ATPase do tipo associada a um fator
FBPase frutose bifosfatase
FCγR grupo de receptores de imunoglobulinas
FDP produto de degradação da fibrina
FGAR formoilglicinamida ribonucleotídeo
FGF fator de crescimento dos fibroblastos
FHH hipercalcemia hipocalciúrica familiar
FI fator intrínseco
FISH hibridização in situ por fluorescência
FMN flavina mononucleotídeo
$FMNH_2$ flavina mononucleotídeo reduzido
FP flavoproteínas
FRA16A sítio A do 16 frágil
FRAXA síndrome do X frágil
Fru-1,6-BP frutose-1,6-bifosfato
Fru-2,6-BP frutose-2,6-bifosfato
Fru-2,6-BPase frutose-2,6 bifosfatase
Fru-6-P frutose-6-fosfato
FSF fator estabilizador da fibrina
FSH hormônio folículo-estimulante
FT fator de transcrição (com qualificador) [TF]
G guanina
G3PDH (GAPDH) gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G6PDH glicose-6-fosfato desidrogenase
GABA ácido γ-aminobutírico
GAG glicosaminoglicana
Gal galactose
Gal-1-P galactose-1-fosfato
GalNAc *N*-acetilgalactosamina
$GalNH_2$ galactosamina
GAP proteína ativadora da guanosina trifosfatase
GAPDH gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GAR glicinamida ribonucleotídeo
GDH glutamato desidrogenase

GDP difosfato de guanosina
GDP-D-Man difosfato de guanosina-D-manose
GDP-L-Fuc difosfato de guanosina-L-fucose
GDP-Man difosfato de guanosina-manose
GFAP proteína ácida fibrilar glial
GGT ou γGT gamaglutamiltransferase/transpeptidase
GH hormônio do crescimento
GHRH hormônio liberador do hormônio do crescimento
GIP peptídeo insulinotrópico glicose-dependente
GIT trato gastrointestinal [TGI]
GK glicocinase
Glc glicose
Glc-1-P glicose-1-fosfato
Glc-6-P glicose-6-fosfato
Glc-6-Pase glicose-6-fosfatase
GlcN-6-P glicosamina-6-fosfato
GlcNac *N*-acetilglicosamina
GlcNAc-1-P *N*-acetilglicosamina-1-fosfato
GlcNAc-6-P *N*-acetilglicosamina-6-fosfato
$GlcNH_2$ glicosamina
GlcUA ácido-D-glicurônico
GLP-1 peptídeo 1 semelhante ao glucagon
GLUT transportador da glicose (GLUT-1-GLUT-5)
GM1 monossialogangliosídeo 1
GMP monofosfato de guanosina
GnRH hormônio liberador de gonadotropina
GPI glicosilfosfatidilinositol
GPIb-IXa etc. receptor glicoproteico 1b-IXa etc.
GPx glutationa peroxidase
GRE elemento responsivo a glicocorticoides
GSH glutationa reduzida
GSSG glutationa oxidada
GTP trifosfato de guanosina
GTPase guanosina trifosfatase
5-HIAA ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT 5-hidroxitriptamina
HAC cromossomo humano artificial

HAT histona acetiltransferase
Hb, HB ou HGB hemoglobina
HbA_{1c} hemoglobina glicosilada
HbF hemoglobina fetal
HCG gonadotropina coriônica
HCM hipercalcemia associada à malignidade
Hct hematócrito [Ht]
HDAC histona desacetilases
HDL lipoproteína de alta densidade [HDL]
HGF fator de crescimento de hepatócito
HGF-R receptor do fator de crescimento de hepatócito
HGPRT hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase
HHV-8 herpesvírus humano 8
HIV vírus da imunodeficiência humana
HLA antígeno leucocitário humano (sistema de)
HLH hélice-alça-hélice (motivo)
HMG hidroximetilglutaril
HMWK cininogênio de alto peso molecular
HNPCC câncer de colo e reto hereditário sem polipose
hnRNA ácido ribonucleico heteronuclear
HPLC cromatografia líquida de alta eficiência
HPT hiperparatireoidismo
HRE elemento de resposta ao hormônio
HRG glicoproteína rica em histidina
HRT terapia de reposição hormonal [TRH]
HSP proteína de choque térmico (*heat shock protein*)
HSV vírus da herpes simples
HTGL triglicerídeo lipase hepática
HTH hélice-volta-hélice (motivo)
HVA ácido homovanílico
HVD vírus da hepatite D
ICAM-1 molécula 1 de adesão intracelular
ICAT marcador de afinidade codificado com isótopo
ICF líquido intracelular [LIC]
ICTP telopeptídeo carboxi-terminal do colágeno tipo 1
IDDM diabetes melito tipo I (abreviatura substituída por diabetes melito tipo I)
IDL lipoproteína de densidade intermediária

IdUA ácido L-idurônico
IFN(-γ) interferon-γ
Ig imunoglobulina
IGF fator de crescimento de insulina
IGF-I fator de crescimento I semelhante à insulina
IL interleucina (IL-1 – IL-29)
IMB índice de metabolismo basal
IMC índice de massa corpórea
IMP monofosfato de inositina
Inr iniciador (sequência de um gene)
IP_1, I-1-P_1, I-4-P_1 etc. monofosfato de inositol
IP_2, I-1, 3-P_2, I-1, 4-P_2 difosfato de inositol
IP_3 inositol 1,4,5-trifosfato
IP_3, I-1, 4, 5-P_3 trifosfato de inositol
IP_4, I-1, 3, 4, 5-P_4 tetrafosfato de inositol
IRE elemento responsivo ao ferro
IRE-BP proteína de ligação do IRE
IRMA ensaio imunorradiométrico
ITAM domínio de ativação do imunorreceptor tipo tirosina cinase
ITIM domínio de inibição do imunorreceptor tipo tirosina cinase
JAK Janus cinase
JNK cinase do *N*-terminal de Jun
K constante de equilíbrio
Kb quilobase
Kbp par(es) de quilobase(s)
KCCT tempo de coagulação do caulim-cefalina
KIP2 molécula reguladora do ciclo celular
K_m constante de Michaelis
LACI inibidor da coagulação associado à lipoproteína
LCAT lecitina-colesterol aciltransferase
LCR líquido cerebroespinhal [CSF]
LDH lactato desidrogenase
LDL lipoproteína de baixa densidade
LEC líquido extracelular [ECF]
LH hormônio luteinizante
LIC líquido intracelular [ICF]

LMA leucemia mieloblástica aguda [AML]
LMC leucemia mieloide crônica [CML]
LPL lipoproteína lipase
LPS lipopolissacarídeo
LRP-LDL proteína relacionada ao receptor de LDL
MAG monoacilglicerol
Malonil-CoA malonil-coenzima A
Man manose
Man-1-P manose-1-fosfato
Man-6-P manose-6-fosfato
MAO monoamina oxidase
MAPK proteína cinase ativada por mitógeno (uma superfamília de cinases transdutoras de sinal)
Mb mioglobina
MCH hemoglobina corpuscular média
MCHC concentração de hemoglobina corpuscular média [CHCM]
MCP-1 proteína 1 quimioatraente de monócito
M-CSF-R receptor do fator estimulante de colônia de macrófagos
MCV volume corpuscular médio [VCM]
MD distrofia miotônica
MDH malato desidrogenase
MDR resistência múltipla às drogas
MEC matriz extracelular [ECM]
MEK cinase de proteína cinase ativada por mitógeno
MEN-IIA neoplasia endócrina múltipla tipo II
MeSH 2-mercaptoetanol
met-tRNA metionil-tRNA
MGUS gamapatia monoclonal de significado indeterminado
MHC complexo maior de histocompatibilidade
miRNAs microRNAs
MPO mieloperoxidase
mRNA ácido ribonucleico mensageiro
MRP proteína associada à resistência múltipla às drogas
MS espectrometria de massa [EM]
MSH hormônio estimulador dos melanócitos
MSUD doença da urina de xarope de bordo
MyoD fator transportador específico da célula muscular

Na^+/K^+-ATPase transportador de sódio e potássio contragradiente, com gasto de ATP
NABQI *N*-acetilbenzoquinoneimina
NAC *N*-acetilcisteína
NAD^+ nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidado)
NADH nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzido)
$NADP^+$ nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (oxidado)
NADPH nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzido)
NANA ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico)
ncRNA RNA não codificador muito pequeno
NEFA ácidos graxos não esterificados
NF fator nuclear
NF-II neurofibromatose tipo II
NGF fator de crescimento de nervo
NIDDM diabetes melito não insulino-dependente [DMNID]
NLS sinal de localização nuclear
NMDA *N*-metil-D-aspartato
NO óxido nítrico
NOS óxido nítrico sintase
NPY neuropeptídeo Y
$1,25(OH)_2D_3$ 1,25-di-hidroxivitamina D_3
NSAID anti-inflamatório não esteroidal [AINES]
NT nucleotídio (como medida de tamanho/comprimento de um ácido nucleico)
NTX telopeptídeo amino-terminal do colágeno
OAA oxaloacetato
OGTT teste de tolerância oral à glicose [TTOG]
8-oxo-G 8-oxo-2′-desoxiguanosina
8-oxo-Gua 8-oxodesoxiguanosina
OPG osteoprotegerina
ORC complexo de reconhecimento da origem
OxS estresse oxidante
P1CP pró-peptídeo carboxi-terminal do pró-colágeno tipo 1
***p38*RK** cinase de reativação *p38*
Pa pascal
PAF fator de ativação de plaquetas
PAGE eletroforese em gel de poliacrilamida
PAI-1 inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PAPS fosfoadenosina fosfossulfato

P-ATPase ATPase do tipo fosforilação
3-PG 3-fosfoglicerato
PC fosfatidilcolina
PC piruvato carboxilase
PCP fenilciclidina
PCR reação em cadeia da polimerase
PD proteína desacopladora [UCP]
PDE fosfodiesterase
PDF produto de degradação de fibrina
PDGF fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF-R receptor de PDGF
PDH piruvato desidrogenase
PDK cinase dependente de trifosfato de fosfatidilionsitol
PE fosfatidil etanolamina
PEP ácido fosfoenolpirúvico
PEPCK fosfoenolpirvato carboxicinase
PF3 fator plaquetário 3
PFGE eletroforese em gel de campo pulsado
PFK-1 (-2) fosfofrutocinase-1 (-2)
PGG_2 etc. prostaglandina G_2 etc.
PGI_2 prostaciclina I_2
PGK fosfogliceratocinase
PGM fosfoglicomutase
PHHI hipoglicemia hiperinsulinêmica persistente da infância
PHP pseudo-hipoparatireoidismo
pI ponto isoelétrico
Pi fosfato inorgânico
PI fosfatidilinositol
PI iodeto de propídio
PI-3-K fosfatidilinositol-3-cinase
PICP peptídeo de extensão aminoterminal do pró-colágeno
PINP pró-peptídeo aminoterminal do pró-colágeno tipo 1
PIP_2/PIP_3 bifosfato/trifosfato de fosfatidilinositol
PK piruvato cinase
PKA/PKC proteína cinase A/C
PKR proteína cinase ativada por dsRNA
PKU fenilcetonúria

PL fosfolipase A etc.
PLA/PLC fosfolipase A/C
PLP fosfato de piridoxal
PLT plaquetas
PMA ácido forbol mirístico
PNPO pirodox(am)ina-5′-fosfato oxidase
PNS sistema nervoso periférico [SNP]
PPAR receptor ativado por agentes que estimulam a proliferação de peroxissomos
PPi pirofosfato inorgânico
PRL prolactina (PL)
PrP proteína príon
PRPP 5-fosforribosil-α-pirofosfato
PS fosfatidilserina
PT tempo de protrombina
PTA antecedente da tromboplastina plasmática
PTGS silenciamento gênico pós-transcricional
PTH paratormônio
PTHrP proteína relacionada ao paratormônio
PTK proteína tirosina cinase
PTPase fosfotirosina fosfatase
PWS síndrome de Prader-Willi
PXSRN sequência peptídica prolina-X-serina-arginina-asparagina
Py base pirimidina (numa sequência de nucleotídeo)
Py2CAPy5 Py-base pirimidínica; C-citidina; A-adenosina
qBH_2 di-hidrobiopterina quinonoide
QS sulfato de queratano (queratan sulfato)
R receptor (com qualificador, não isolado)
RABP proteína de ligação específica do ácido retinoico
RAIDD proteína acessória do "domínio da morte"
RANK ativador do receptor de NFκB
RANKL ligante do RANK
Rb proteína do retinoblastoma
RBC hemácia [CVS]
RDS síndrome da disfunção respiratória
RE retículo endoplasmático [ER]
RER retículo endoplasmático rugoso
RFLP polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

RGD sequência peptídica arginina-glicina-aspartato
RIP proteína acessória do "domínio da morte"
RKK homólogo p38RK de MEK
RM ressonância magnética
RMN ressonância magnética nuclear
RNA ácido ribonucleico
RNAi RNA de interferência
RNAPol II RNA polimerase II
RNR ribonucleotídeo redutase
RNS espécies reativas do nitrogênio [ERN]
ROS espécies reativas do oxigênio [ERO]
RRX receptor X retinoico
RS retículo sarcoplasmático
RSV vírus respiratório sincicial
RT-PCR PCR em tempo real
S svedberg (unidade)
SACAIR 5-aminoimidazol-4-(*N*-succinilocarboxamida) ribonucleotídeo
SAM *S*-adenosilmetionina
SAP1 tipo de fator de transcrição
SAPK proteína cinase ativada por estresse
SARA síndrome da insuficiência respiratória aguda [ARDS]
SCA I ataxia espinocerebelar
SCA III doença de Machado-Joseph
SCAP proteína de ativação da clivagem de SREBP
SCID imunodeficiência combinada grave
SCIDS síndrome de imunodeficiência combinada grave
scuPA ativador do plasminogênio do tipo urinário de cadeia única
SD desvio padrão
SDS sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato
SEK homológo SAPK de MEK
SER retículo endoplasmático liso
SER elemento responsivo a esteroide
SERBP proteína de ligação ao elemento de resposta a esteroide
SERM modulador seletivo dos receptores de estrogênio
ser-P serina-fosfato
SGLT transportador de glicose acoplado ao Na^+ (simporte)

SH hormônio esteroide (figuras somente)
SH2 região-2 de homologia a Src
SHBG globulina de ligação de hormônios sexuais
SHP fosfatase contendo o domínio SH2
SIADH síndrome da secreção inadequada do hormônio antidiurético
siRNA pequeno RNA de interferência
SNC sistema nervoso central [CNS]
snoRNA pequeno RNA nucleolar
snoRNP ribonucleoproteína nucleolar pequena
SNP sistema nervoso periférico [PNS]
SNP polimorfismos de base única
snRNA RNA nuclear pequeno
SNRPN proteína ribossomal nuclear pequena N
SOD superóxido dismutase
SPCA acelerador sérico de conversão de protrombina
SRBP proteína sérica de ligação ao retinal
Src tipo de proteína tirosina cinase
SRE elemento de resposta a esteroide
SRP partícula de reconhecimento de sinal
SSBP proteína que se liga ao DNA de fita simples
SSCP polimorfismo conformacional de fita simples
SSRI inibidor seletivo da recaptação de serotonina
STAT transdutor de sinal e ativador da transcrição
STR pequena repetição *in tandem*
SUR receptor da sulfonilureia
T timina
T_3 triiodotironina
T_4 tiroxina
TAG triacilglicerol (triglicerídeo)
TAP tempo de atividade de protrombina
TAP transportador de peptídeo no RE associado à apresentação de antígeno
TB tuberculose
TBG globulina transportadora de hormônio da tireoide
TBP proteína de ligação ao TATA
3TC 2′3′-didesoxi-3′-tiacitidina
TC tomografia computadorizada
TCA ácido tricarboxílico

TCR receptor de antígeno de célula T
tcuPA urocinase (forma mais ativa de cadeia dupla)
TdT desoxinucleotidil transferase terminal
TF fator de transcrição (com qualificador) [FT]
TFPI inibidor da via do fator tecidual
TG triacilglicerol (triglicerídeo)
TGF(-β) fator β da transformação do crescimento
TGI trato gastrointestinal [GIT]
THF tetraidrofolato
TIM translocase na membrana mitocondrial interna [TMMI]
TK timidina cinase
$\mathbf{T_m}$ temperatura de desnaturação do DNA
$\mathbf{T_{max}}$ velocidade máxima de transporte
TMME translocase na membrana mitocondrial externa [TOM]
TMMI translocase na membrana mitocondrial interna [TIM]
Tn troponina
TNF fator de necrose tumoral
TNF-R receptor do fator de necrose tumoral
TOM translocase na membrana mitocondrial externa [TMME]
tPA ativador do plasminogênio do tipo tecidual
TRADD proteína acessória com "domínio da morte"
TRAF fator citoplasmático associado ao TNF-R
TRAFS proteína acessória com "domínio da morte"
TRH hormônio liberador da tireotropina
tRNA RNA de transferência
TSH hormônio tireoestimulante (tireotropina)
TT tempo de trombina
TTF1 fator de terminação de transcrito 1
TTOG teste de tolerância oral à glicose [OGTT]
TTP trifosfato de timidina
Túbulo T túbulo transversal
$\mathbf{TXA_2}$ tromboxano A_2
U uridina
UCP proteína desacopladora [PD]
UDP difosfato de uridina
UDP-Gal UDP-galactose
UDP-GalNAc UDP-*N*-acetilgalactosamina

UDP-Glc UDP-glicose
UDP-GlcNAc UDP-*N*-acetilglicosamina
UDP-GlcUA UDP ácido glicurônico
UMP monofosfato de uridina
uPA ativador do plasminogênio do tipo urinário
UPRTase uracilfosforribosiltransferase
UV ultravioleta
VCAM-1 molécula 1 de adesão de células vasculares
VDCC canais de cálcio voltagem-dependente (ou dependentes de voltagem) [CCVD]
VEGF fator de crescimento endotelial vascular
VHS velocidade de hemossedimentação
VIP peptídeo intestinal vasoativo
VLDL lipoproteína de muito baixa densidade
VNTR repetição *in tandem* de número variável
VSV vírus da estomatite vesicular
vWF fator de von Willenbrand
WAF1 regulador do ciclo celular
XIST transcrito específico do X inativo
XMP monofosfato de xantina
XO xantina oxidase
XP xeroderma pigmentosum
X-SCID imunodeficiência combinada grave ligada ao X
YAC cromossomo artificial de levedura
ZP3 glicoproteína 3 da zona pelúcida

REVISÃO CIENTÍFICA

Aline Simões Fraga (Cap. 42)
Professora Substituta Auxiliar do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Alcantara Gomes da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro (UERJ)
Doutora em Biociências pela UERJ
Mestre em Biociências Nucleares pela UERJ

Amanda Chaves Pinho (Caps. 5 e 41)
Mestre em Biologia pela UERJ
Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas pela UERJ
Docente Substituta Auxiliar (de 08/2007 a 02/2008) do
Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Roberto
Alcantara Gomes da UERJ

Ana Maria Rossini Teixeira (Caps. 2, 3, 12 e 13)
Professora Adjunta do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ
Doutora em Ciências pela UERJ

Artur Pedro do Carmo Moes (Cap. 28)
Doutorando em Biologia pela Pós-graduação em Biociências da UERJ
Mestre em Biologia pela Pós-graduação em Biociências Nucleares da UERJ
Graduado em Ciências Biológicas pela Fundação Educacional da Região dos Lagos, RJ

Cintia Fernandes de Souza (Caps. 36 e 40)
Mestre em Biologia Parasitária pelo Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), RJ
Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biologia da UERJ

Fabiana Siqueira Ribeiro (Caps. 34, 37 e Índice)
Professora Docente I do Estado do Rio de Janeiro
Doutora e Mestre em Biologia (Biociências Nucleares) pela UERJ

Frederico Freire Bastos (Cap. 11)
Professor Substituto do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UERJ
Doutor e Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Biologia da UERJ

Jacyara Maria Brito Macedo (Caps. 7, 31, 32, 35 e 43)
Professora Adjunta do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia

Roberto Alcantara Gomes da UERJ

Pós-doutorado nas áreas de Virologia Molecular e Tecnologia Enzimática pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

PhD em Genética pela Universidade de Leeds, Reino Unido

Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela UFRJ

Kátia Costa de Carvalho Sabino (Caps. 1, 16, 18 e 26)

Professora Adjunta do Departamento de Bioquímica da UERJ

Doutora em Biologia pela UERJ

Marcia Cristina Paes (Caps. 9, 14 e 15)

Professora Adjunta e Procientista do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UERJ

Pós-doutorado pela University of Bath, Reino Unido

Doutora em Química Biológica pela UFRJ

Mestre em Química Biológica pela UFRJ

Marsen Garcia Pinto Coelho (Cap. 4)

Professora Associada do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ

Coordenadora de pesquisa e de captação de recursos do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ

Doutora em 1988 pela UFRJ

Mestre em 1979 pela UFRJ

Monica Farah Pereira (Caps. 8, 10 e 33)

Doutora e Mestre em Biologia pela UERJ

Natalia Pereira de Almeida Nogueira (Caps. 22, 27, 44 e Apêndice)

Professora Substituta do Departamento de Bioquímica da UERJ

Mestre em Química Biológica pelo Instituto de Bioquímica

Médica da UFRJ

Rafael Ferreira Dantas (Cap. 25)

Professor Substituto Auxiliar do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ

Doutor em Biociências pela UERJ

Mestre em Biociências Nucleares pela UERJ

Sergio R. Dalmau (Caps. 17, 20, 30, 38 e 39)

Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UERJ

Coordenador do Curso de Bioquímica para Medicina (2000-10) da UERJ

Visiting Research Fellow do Swiss Institute for Cancer Research 1983, Lausanne,

Suíça

Doutor em Biologia Celular e Molecular (1996) pelo Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), RJ

Mestre em Bioquímica (1983) pelo Instituto de Química da UFRJ

Tatiana de Almeida Simão (Caps. 19, 21, 23 e 24)

Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ

Doutor e Mestre em Biologia (Biociências Nucleares) pela UERJ

Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos (Caps. 6 e 29)

Professora Adjunta do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UERJ

Coordenadora de Graduação do Instituto de Biologia da UERJ

Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Biologia da UERJ

Mestre em Ciências pelo Curso de Pós-graduação do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ

Visiting Research Assistant da University of Alberta, Canadá

Table of Contents

Front Matter

Copyright

Prefácio

Colaboradores

Dedicatória

Agradecimentos

Abreviaturas

REVISÃO CIENTÍFICA

Capítulo 1: Introdução

Capítulo 2: Aminoácidos e Proteínas

Capítulo 3: Carboidratos e Lipídios

Capítulo 4: Sangue: Células e Proteínas Plasmáticas

Capítulo 5: Transporte de Oxigênio

Capítulo 6: Proteínas Catalisadoras — Enzimas

Capítulo 7: Hemostasia e Trombose

Capítulo 8: Membranas e Transporte

Capítulo 9: Bioenergética e Metabolismo Oxidativo

Capítulo 10: Função do Trato Gastrointestinal

Capítulo 11: Micronutrientes: Vitaminas e Minerais

Capítulo 12: Metabolismo Anaeróbico da Glicose nos Eritrócitos

Capítulo 13: Armazenamento e Síntese de Carboidratos no Fígado e no Músculo

Capítulo 14: O Ciclo do Ácido Tricarboxílico

Capítulo 15: Metabolismo Oxidativo de Lipídios no Fígado e no Músculo

Capítulo 16: Biossíntese e Armazenamento de Ácidos Graxos

Capítulo 17: Biossíntese de Colesterol e Esteroides

Capítulo 18: Lipoproteínas e Transporte de Lipídios

Capítulo 19: Biossíntese e Degradação de Aminoácidos

Capítulo 20: Músculo: Metabolismo Energético e Contração

Capítulo 21: Homeostase da Glicose e Metabolismo Energético

Capítulo 22: Nutrição e Balanço Energético

Capítulo 23: Homeostase da Água e de Eletrólitos

Capítulo 24: Regulação da Concentração do Íon Hidrogênio (Equilíbrio Acidobásico)

Capítulo 25: Metabolismo do Cálcio e do Osso

Capítulo 26: Carboidratos Complexos: Glicoproteínas

Capítulo 27: Lipídios Complexos

Capítulo 28: A Matriz Extracelular

Capítulo 29: Papel do Fígado no Metabolismo

Capítulo 30: Biossíntese e Degradação de Nucleotídeos

Capítulo 31: Ácido Desoxirribonucleico

Capítulo 32: Ácido Ribonucleico

Capítulo 33: Síntese e Reciclagem de Proteínas

Capítulo 34: Regulação da Expressão Gênica

Capítulo 35: Tecnologia do DNA Recombinante

Capítulo 36: Genômica, Proteômica e Metabolômica

Capítulo 37: Oxigênio e Vida

Capítulo 38: A Resposta Imune

Capítulo 39: Endocrinologia Bioquímica

Capítulo 40: Receptores de Membrana e Transdução de Sinal

Capítulo 41: Neuroquímica

Capítulo 42: Neurotransmissores

Capítulo 43: Homeostasia Celular: Crescimento Celular, Diferenciação e Câncer

Capítulo 44: Envelhecimento

Seleção de faixas de referência de laboratório clínico

Índice

Introdução

J.W. Baynes

M.H. Dominiczak

BIOQUÍMICA E MEDICINA CLÍNICA

Visão Geral

A bioquímica médica cobre aspectos da bioquímica relevantes para medicina e explica como o corpo trabalha como um sistema químico. Ela explica o malfuncionamento do corpo na doença e orienta como as terapias devem ser planejadas para restaurar as funções corporais. Ela fornece a base para entender a ação de novas drogas, como antidepressivos, drogas usadas no tratamento da diabetes, hipertensão e insuficiãncia cardíaca, e aquelas que reduzem lipídios no sangue. Ela auxilia na compreensão de aplicações clínicas de proteínas recombinantes e vetores virais. A bioquímica médica auxilia a entender como o estilo de vida, e particularmente a dieta, influencia nosso desempenho e como o organismo envelhece. Ela descreve como a sinalização celular e sistemas de comunicação estão envolvidos na resposta a estresses endógenos e ambientais, além da ação de novas drogas que agem sobre eles. Ela também chama a atenção para o enorme progresso dos últimos anos na compreensão da genética humana e fornece uma estrutura para o estudo de áreas emergentes como a nutrigenômica e farmacogenômica, esperando-se que se crie uma base para tratamentos personalizados baseados na composição genética de cada indivíduo.

Foco

O organismo humano é, por um lado, um sistema metabólico integrado cuidadosamente controlado e, por outro lado, um sistema que é aberto e se comunica com o ambiente. Apesar destas duas características aparentemente contraditórias, o corpo trabalha para manter seu ambiente interno por décadas. Completamos regularmente nosso estoque de combustível (consumo de alimento) e água, e captamos oxigãnio do ar inspirado para ser usado no metabolismo oxidativo (a respiração é, de fato, uma reação de combustão em baixa temperatura e controlada). Usamos a energia gerada pelo metabolismo para realizar trabalho e manter a temperatura corporal. Eliminamos (exalamos ou excretamos) dióxido de carbono, água e resíduos nitrogenados. A quantidade e a composição dos alimentos que consumimos tãm impactos significativos em nossa saúde – tanto a desnutrição quanto a obesidade são atualmente os principais problemas de saúde pública no mundo. Uma das razões mais importantes para o estudo da bioquímica é entender as interações entre a nutrição, o metabolismo e a genética nos estados de saúde e doença.

BIOQUÍMICA EM DUAS PÁGINAS

Os editores afirmam que qualquer texto pode ser resumido, não importando quão importantes sejam os detalhes. A seguir, tentamos condensar nosso livro em menos de duas páginas. Isso fornece uma visão bem geral, mas também cria uma estrutura mental útil para um estudo posterior. Os termos em destaque apresentam os conteúdos dos capítulos que se seguem.

Os principais componentes estruturais do corpo são as proteínas, os carboidratos e os lipídios

As **proteínas** são blocos de construção e catalisadores; como unidades estruturais, elas formam a estrutura arquitetônica de nossos tecidos; como enzimas, juntamente com moléculas auxiliares conhecidas como **coenzimas** e **cofatores**, elas catalisam e controlam reações BIOQUÍmicas.

Carboidratos e **lipídios** são utilizados sobretudo como fonte de energia. Suas formas de armazenamento no corpo são o glicogãnio e os triglicerídeos. Carboidratos estão também presentes como glicoconjugados com proteínas e lipídios, e os lipídios formam a espinha dorsal das membranas biológicas.

Variáveis químicas, como o **pH**, **pressão de oxigãnio, concentrações de íons inorgânicos e tampões**, definem o ambiente homeostático em que ocorre o metabolismo. Pequenas alterações nesse ambiente, por exemplo, menos de um décimo de uma unidade de pH, podem gerar risco à vida. Todas as terapias, incluindo intervenções de emergãncia, visam manter sua estabilidade.

O sangue é o meio para troca de gases, combustíveis, metabólitos e informações entre os tecidos. O plasma sanguíneo é uma "janela" acessível para o metabolismo e serve como fonte de informações clínicas para o diagnóstico e tratamento na doença. O **sistema de coagulação sanguínea** e o **sistema imune** protegem contra distúrbios neste ambiente.

As **membranas biológicas** compartimentalizam as vias metabólicas. Elas exercem um papel fundamental no transporte de íons e metabólitos, e também **na transdução de sinais** de uma célula para outra. A maior parte da energia no corpo é utilizada para manter os gradientes de concentração de íons e metabólitos através das membranas biológicas; a função do nervo e do músculo, e os eritrócitos são dependentes críticos dos potenciais de membrana, os quais são utilizados para transmissão nervosa, contração muscular e manutenção do formato das células.

A energia fornecida pelos nutrientes é distribuída por toda célula sob a forma de adenosina trifosfato

A recuperação e utilização de energia em sistemas biológicos ocorrem por meio da **fosforilação oxidativa** que ocorre na **mitocôndria**. Este processo envolve consumo de oxigãnio – ou **respiração** – na qual capturamos a energia dos combustíveis, produzimos um gradiente de íon hidrogãnio e utilisamos esta energia para formar **adenosina trifosfato (ATP)**. Os BIOQUÍmicos se referem ao ATP como a "moeda corrente do metabolismo" para troca de energia metabólica. Ela conserva a energia do metabolismo dos combustíveis para ser usada no trabalho, transporte e biossíntese.

Vias centrais do metabolismo glicídico e lipídico são rotas de acesso para outros processos

Açúcares e gorduras são nossas fontes primárias de energia, mas as necessidades nutricionais também incluem aminoácidos ou **proteínas** e micronutrientes – **vitaminas e oligoelementos**.

A glicose é metabolizada pela **glicólise**, uma via anaeróbica universal para produção de energia. A glicólise transforma a glicose em piruvato, deixando a etapa do metabolismo oxidativo para a

mitocôndria. Também produz metabólitos que são precursores para síntese de **aminoácidos**, **proteínas**, **lipídios** e **ácidos nucleicos**. As enzimas glicolíticas são reguladas por diversos mecanismos: pequenas moléculas efetoras, modificações químicas reversíveis e irreversíveis de enzimas-chave, e pelo controle da expressão gênica.

A manutenção de uma concentração normal da glicose sanguínea é essencial para nossa sobrevivência e está ligada ao metabolismo do **glicogênio**, a forma de armazenamento de curto prazo da glicose. A homeostasia da glicose é regulada por hormônios (principalmente insulina e glucagon, e também epinefrina) que coordenam atividades metabólicas entre células e órgãos.

O oxigênio é essencial para a sobrevivência, mas também pode ser tóxico

Durante o metabolismo aeróbico, o piruvato é transformado em **acetil coenzima A (acetil-CoA)**, que é o intermediário comum no metabolismo de carboidratos, lipídios e aminoácidos. A acetil-CoA entra no mecanismo metabólico central da célula, o **ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo TCA)** nas mitocôndrias. Acetil-CoA é oxidada a **dióxido de carbono** e reduz coenzimas importantes, **nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD)**. A redução destes dinucleotídeos capta a energia liberada pela oxidação do substrato combustível e estes são, por sua vez, os substratos para a via final: **a fosforilação oxidativa**. Estes tornam-se oxidados pelo oxigênio molecular por meio de uma cadeia de reações de **transporte de elétron**, fornecendo a energia para a **síntese de ATP**.

Enquanto o oxigênio é essencial para o metabolismo aeróbico, este também pode causar estresse oxidativo e espalhar danos ao tecido durante a inflamação. Para nos proteger de mais efeitos danosos do oxigênio, somos dotados de poderosas **defesas antioxidantes**.

A alimentação e o jejum alternam o metabolismo do corpo entre os estados anabólico e catabólico

A vida pode ser dividida num ciclo contínuo de alimentação e jejum. As principais vias do metabolismo de carboidratos e lipídios são parcialmente reversíveis e suas direções se modificam em resposta à ingestão de alimentos. A direção do metabolismo é constantemente alterada durante o ciclo alimentação-jejum. No estado alimentado, as vias ativas são **glicólise**, **síntese de glicogênio**, **lipogênese** e **síntese de proteínas**, renovando os tecidos e armazenando o excesso de combustível metabólico. No estado de jejum, a direção do metabolismo é revertida: o glicogênio e os lipídios armazenados são degradados por meio da **glicogenólise** e **lipólise**. A proteína é convertida em glicose pela via da **gliconeogênese** e outros processos biossintéticos se tornam lentos. Os desajustes de combustível metabólico, que frequentemente se desenvolvem com a idade, levam a **diabetes** e **dislipidemias**, e são os principais contribuintes da **ateroesclerose**.

Os tecidos executam funções especializadas

Essas funções incluem contração muscular, condução nervosa, resposta imune, sinalização hormonal, manutenção do pH e balanço eletrolítico, desintoxicação de substâncias exógenas e formação óssea. Microestruturas especializadas como os **glicoconjugados** (glicoproteínas, glicolipídeos e proteoglicanas) exercem um papel crucial na organização tecidual, interações célula-célula e na estrutura e função da matriz extracelular.

O genoma e a sinalização celular englobam tudo isso

O genoma fornece o mecanismo de conservação e transferência da informação genética, a regulação da expressão gênica e o controle da síntese de proteína. A síntese de proteína é controlada pela informação codificada no **ácido desoxirribonucleico (DNA)** e transcrita para **ácido**

ribonucleico (RNA), que é então traduzido em peptídeos, que são enovelados formando **moléculas proteicas funcionais**. O perfil de proteínas expresso e o controle de sua expressão temporal durante o desenvolvimento, adaptação e envelhecimento são responsáveis pela nossa composição proteica.

Aplicações das tecnologias de **DNA recombinante** e da reação em cadeia da polimerase (PCR) tãm revolucionado o trabalho de laboratórios clínicos durante a última década. A capacidade recente de analisar cuidadosamente todo o genoma e o potencial da **proteômica** criam uma oportunidade de ganhar nova compreensão na dinâmica da síntese de proteína dirigida pelo gene. Finalmente, **o crescimento celular**, **a sinalização** e **os mecanismos de reparo** são importantes para a sobrevivância, e o declínio dependente do tempo destes sistemas leva ao **envelhecimento** e desenvolvimento de doenças como **o câncer**.

Resumimos tudo isso na Figura 1.1, que não parece tão diferente do desenho de um metrô subterrâneo de Londres (Leituras Sugeridas). Não se intimide com os muitos termos ainda não conhecidos e volte a essa figura quando estudar capítulos diferentes para ver como sua compreensão da BIOQUÍmica aumenta.

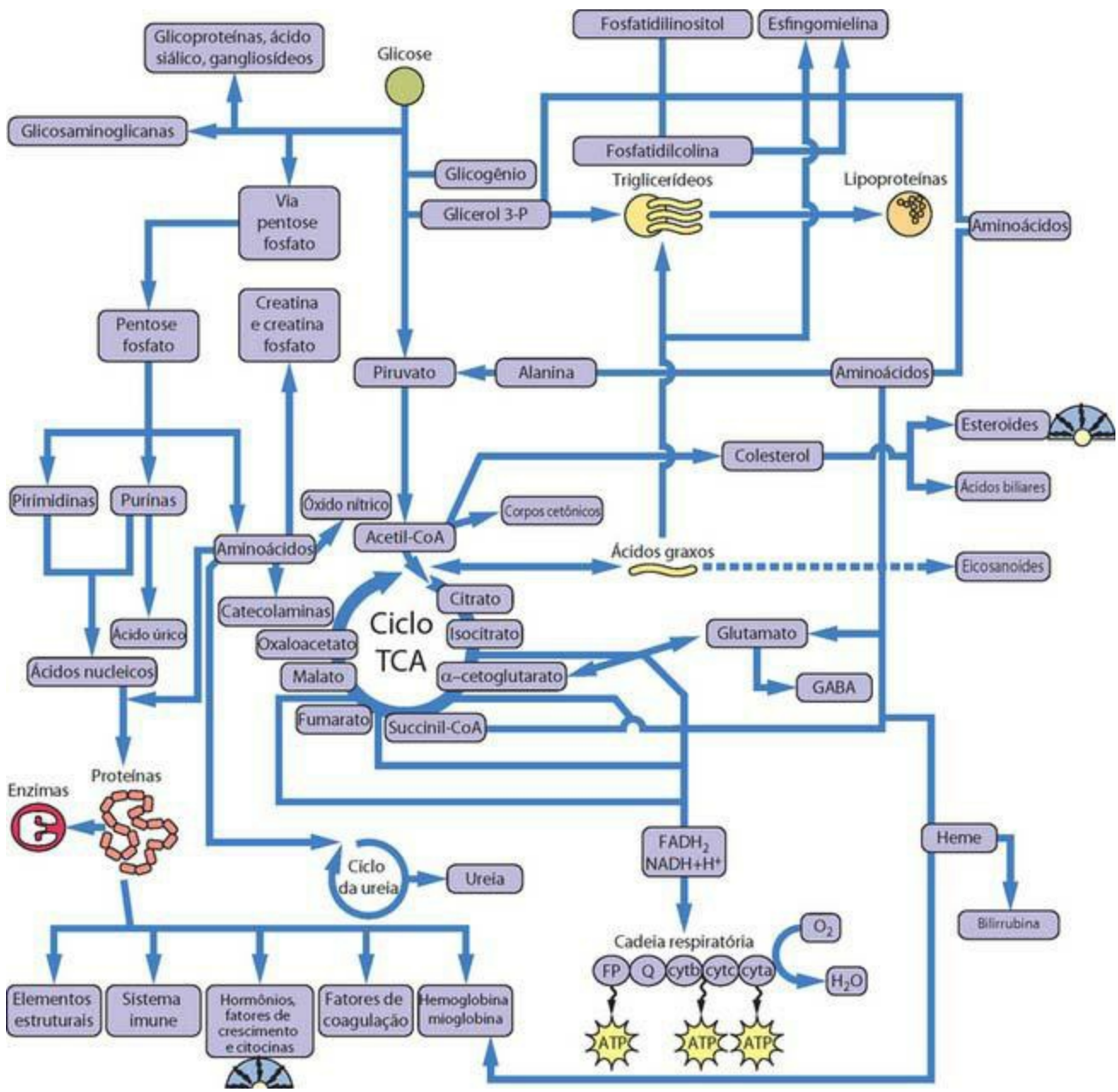


Fig. 1.1 **Bioquímica: visão geral.** Inter-relações entre as vias bioquímicas. Esta figura foi desenhada para lhe dar uma visão

panorãmica do assunto. Ela pode ajudar a estruturar o seu estudo ou revisão. Volte a essa figura quando estiver estudando o livro e veja como vocã ganha perspectiva em bioquímica. GABA, γaminobutirato; glicerol-3-P, glicerol-3-fosfato; CoA, coenzima A; TCA, ácido tricarboxílico; cit, citocromo, FP, fl avoproteína; Q, coenzima Q_{10}; ATP, adenosina 5′-trifosfato.

PALAVRA FINAL

Na formação médica atual, os estudantes direcionam seu aprendizado para adquirir conhecimentos que sejam a estrutura para o estudo ao longo da carreira. Estudar fragmentos da medicina por meio de especialidades limitadas é menos valioso que o aprendizado integrado, que permite aplicar o conhecimento adquirido em um contexto mais amplo. Este livro tenta fazer o mesmo com a BIOQUÍmica. Encorajamos o estudante a refletir continuamente sobre questões clínicas e correlacionar conhecimento adquirido a situações clínicas cotidianas.

Ao consultar este livro, tenha em mente que ele não foi concebido como um texto de revisão ou fonte didática para preparar para exames de múltipla escolha. Esses materiais estão disponíveis separadamente em nosso site. Este texto é uma apresentação integrada, orientada para os aspectos da BIOQUÍmica clínica relevantes para a medicina: uma base de consulta para sua carreira clínica. Ele é menor do que muitos dos grandes volumes da nossa disciplina e é direcionado não para o acúmulo de conhecimentos factuais, mas para o desenvolvimento de ideias e relações, que esperamos serem retidas em sua memória, e que serão úteis na prática clínica, mesmo muito depois de vocã deixar a sala de conferãncias.

Acima de tudo, o livro *BIOQUÍmica Médica* foi escrito porque acreditamos que entender BIOQUÍmica auxilia na prática da medicina clínica. Portanto, no texto ligamos a ciãncia básica à s situações que um médico se depara com seus pacientes à cabeceira do leito, no consultório médico e quando estiver lidando com o laboratório clínico. Nossos casos clínicos foram examinados por clínicos e laboratoristas que lidam com pacientes reais diariamente para garantir que estes reflitam problemas práticos que vocã encontrará na sua carreira como médico. Esperamos que os conceitos aprendidos aqui o auxiliem em tais ocasiões – e beneficiem seus pacientes.

Leituras sugeridas

Cooke M, Irby DM, Sullivan W, Ludmerer KM. American medical education 100 years after the Flexner report. *N Engl J Med*. 2006;355:1339-1344.

Dominiczak MH. Teaching and training laboratory professionals for the 21st century. *Clin Chem Lab Med*. 1998;36:133-136.

Jolly B, Rees L, editors. Medical education in the millennium. Oxford: Oxford University Press. 1998: 1-268

Ludmerer KM. Learner-centered medical education. *N Engl J Med*. 2004;351:1163-1164.

Aminoácidos e Proteínas

N. Taniguchi

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Classificar os aminoácidos com base em sua estrutura química e carga.
- Explicar o significado dos termos pK_a e pI, quando aplicados a aminoácidos e proteínas.
- Descrever os elementos das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas.
- Descrever os princípios da cromatografia por troca iônica e por filtração em gel, da eletroforese e da focalização isoelétrica, e descrever suas aplicações no isolamento e caracterização das proteínas.
- Explicar o princípio da espectrometria de massas por eletrospray e MALDI-TOF e suas aplicações em proteômica.

INTRODUÇÃO

As proteínas são os polímeros estruturais e funcionais dos sistemas vivos. Apresentam uma ampla gama de atividades, incluindo a catálise de reações metabólicas e o transporte de vitaminas, minerais, oxigênio e substâncias combustíveis. Algumas proteínas compõem a estrutura dos tecidos, enquanto outras participam da transmissão nervosa, da contração muscular e da motilidade celular, e outras ainda da coagulação sanguínea, da defesa imunológica ou como hormônios e moléculas reguladoras. As proteínas são sintetizadas como uma sequência de aminoácidos unidos formando uma estrutura poliamídica linear (polipeptídios), porém elas assumem formas tridimensionais complexas para desempenhar suas funções. Há aproximadamente 300 aminoácidos nos diversos sistemas animais, vegetais e microbianos, mas apenas 20 aminoácidos codificados pelo DNA estão presentes nas proteínas. Muitas proteínas também contêm aminoácidos modificados e componentes acessórios, denominados grupos prostéticos. Diversas técnicas químicas são empregadas para isolar e caracterizar proteínas empregando uma variedade de critérios incluindo a massa, a carga e a estrutura tridimensional. A proteômica é uma área emergente que estuda os aspectos globais da expressão das proteínas em uma célula ou organismo e as modificações da expressão das proteínas em resposta ao crescimento, aos hormônios, ao estresse e ao envelhecimento.

AMINOÁCIDOS

Estereoquímica: a configuração do carbono α, isômeros D e l

Cada aminoácido tem um carbono central, denominado carbono α, ao qual estão ligados quatro grupos diferentes (Fig. 2.1):

- um grupo amino básico (—NH_2)
- um grupo carboxila ácido (—COOH)
- um átomo de hidrogênio (—H)
- uma cadeia lateral distinta (—R)

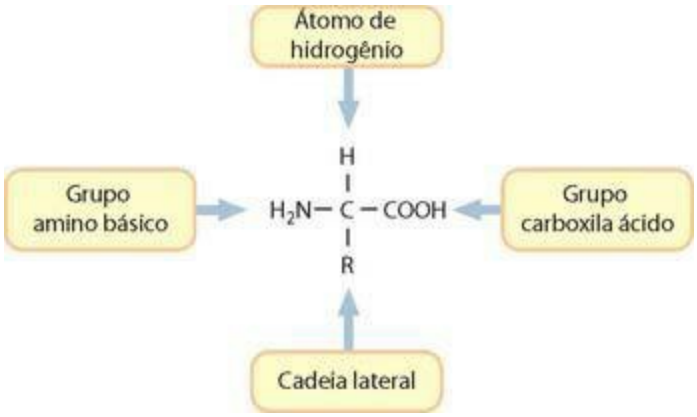


Fig. 2.1 Estrutura de um aminoácido. Com exceção da glicina, há quatro grupos diferentes ligados ao carbono α de um aminoacido. A Tabela 2.1 lista as estruturas dos grupos R.

Um dos 20 aminoácidos, a prolina, não é um α-aminoácido, mas sim um α-iminoácido (ver adiante). Com exceção da glicina, todos os aminoácidos contêm pelo menos um átomo de carbono assimétrico (o átomo de carbono α), que dá origem a dois isômeros, que são oticamente ativos, isto é, são capazes de promover a rotação do plano da luz polarizada. Esses isômeros, denominados estereoisômeros ou enantiômeros, são ditos quirais, um termo derivado da palavra grega *kiros*, que significa mão. Tais isômeros são imagens especulares não sobreponíveis e são análogos Às mãos esquerda e direita, como mostra a Figura 2.2. As duas configurações dos aminoácidos são denominadas D (de *dextro* ou direta) e L (de *levo* ou esquerda). Todos os aminoácidos nas proteínas estão na configuração L porque as proteínas são biossintetizadas por enzimas que inserem apenas L-aminoácidos nas cadeias peptídicas.

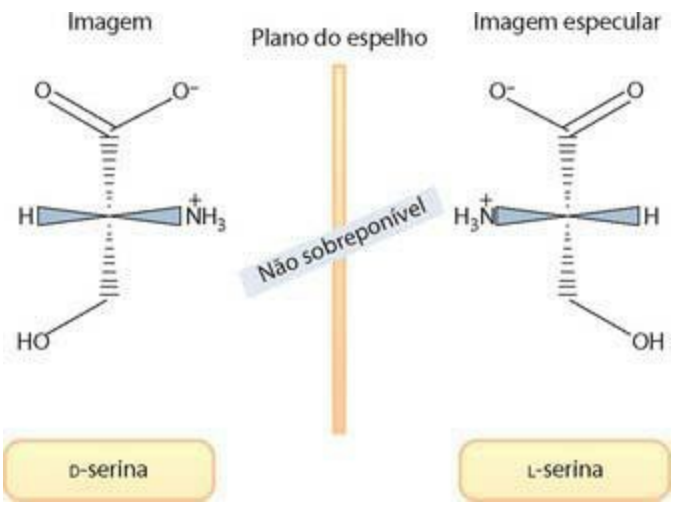


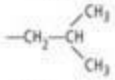
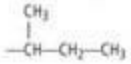
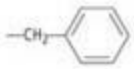
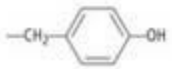
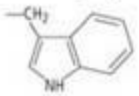
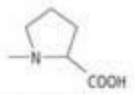
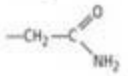
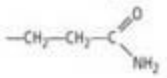
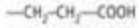
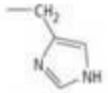
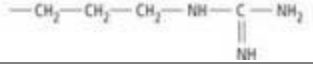
Fig. 2.2 Enantiômeros. O par de imagens especulares dos aminoácidos. Cada aminoácido representa uma imagem especular não sobreponível. Os estereoisômeros da imagem especular são enantiômeros. Apenas os L-enantiômeros estão presentes nas proteínas.

Classificação dos aminoácidos com base na estrutura química

As propriedades de cada aminoácido são dependentes de sua cadeia lateral (—R); as cadeias laterais são grupos funcionais que constituem os principais determinantes da estrutura e função das proteínas, assim como da carga elétrica da molécula. O conhecimento das propriedades dessas cadeias laterais é importante para a compreensão dos métodos de análise, purificação e identificação das proteínas. Os aminoácidos com cadeias laterais polares, hidrofílicas ou dotadas de carga estão geralmente expostos na superfície das proteínas. Os resíduos hidrofóbicos apolares geralmente estão mergulhados no interior hidrofóbico ou núcleo proteico e fora do contato com a água. Os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas, codificados pelo DNA, estão listados na Tabela 2.1 e são classificados de acordo com os grupos funcionais de suas cadeias laterais.

Tabela 2.1 Os 20 aminoácidos encontrados nas proteinas. As abreviações de uso comum feitas com três letras e com uma letra estão entre parênteses.

Os 20 α-aminoácidos especificados pelo código genético

Aminoácidos	Estrutura do radical R
Aminoácidos alifáticos	
glicina (Gly, **G**)	
alanina (Ala, **A**)	
valina (Val, **V**)	
leucina (Leu, **L**)	
isoleucina (Ile, **I**)	
Aminoácidos que contêm enxofre	
cisteína (Cys, **C**)	
metionina (Met, **M**)	
Aminoácidos aromáticos	
fenilalanina (Phe, **F**)	
tirosina (Tyr, **Y**)	
triptofano (Trp, **W**)	
Iminoácido	
prolina (Pro, **P**)	 (Estrutura inteira)
Aminoácidos neutros	
serina (Ser, **S**)	
treonina (Thr, **T**)	
asparagina (Asn, **N**)	
glutamina (Gln, **Q**))	
Aminoácidos ácidos	
ácido aspártico (Asp, **D**)	
ácido glutâmico (Glu, **E**)	
Aminoácidos básicos	
histidina (His, **H**)	
lisina (Lys, **K**)	
arginina (Arg, **R**)	

Aminoácidos alifáticos

Os aminoácidos alanina, valina, leucina e isoleucina, classificados como aminoácidos alifáticos, possuem hidrocarbonetos saturados como cadeias laterais. A glicina, que possui apenas um hidrogênio como cadeia lateral, está incluída nesse grupo. A alanina tem uma estrutura relativamente simples, contando com um grupo metil na cadeia lateral, enquanto a leucina e a isoleucina possuem grupos *sec*-butil e *iso*-butil, respectivamente. Todos esses aminoácidos têm natureza hidrofóbica.

Aminoácidos aromáticos

A fenilalanina, a tirosina e o triptofano têm cadeias laterais aromáticas. Os aminoácidos aromáticos e alifáticos apolares estão normalmente inseridos no núcleo proteico e envolvidos nas interações hidrofóbicas entre eles. A tirosina tem um grupo hidroxila fracamente ácido e pode estar localizada na superfície proteica. A fosforilação reversível do grupo hidroxila da tirosina de algumas enzimas é importante na regulação de vias metabólicas. Os aminoácidos aromáticos são responsáveis pela absorção da luz ultravioleta na maioria das proteínas, cuja absorção máxima ocorre em torno de 280 nm. O triptofano apresenta uma absorção maior nessa região quando comparado aos outros dois aminoácidos aromáticos. O coeficiente de absorção molar de uma proteína é útil para a determinação espectrofotométrica de sua concentração em solução. O espectro de absorção característico dos aminoácidos aromáticos está representado na Figura 2.3.

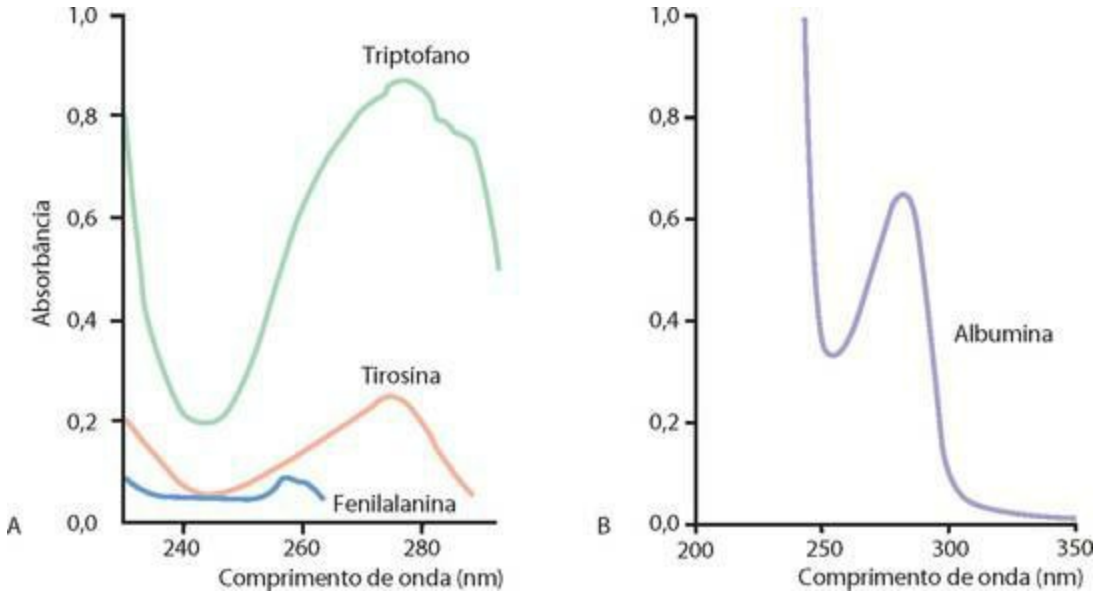


Fig. 2.3 Espectros de absorção da radiação ultravioleta pelos aminoácidos aromáticos e pela albumina sérica bovina. (A) Aminoácidos aromáticos tais como o triptofano, a tirosina e a fenilalanina possuem absorbância máxima em ~280 nm. Cada proteína purificada tem um coeficiente de absorção molecular diferente, por volta de 280 nm, dependendo de seu conteúdo de aminoácidos aromáticos. (B) Uma solução de albumina sérica bovina (1 mg dissolvida em 1 mL de água) tem uma absorbância de 0,67 a 280 nm com o uso de uma cubeta de 1 cm. Os coeficientes de absorção das proteínas são frequentemente expressos como $E_{1\%}$ (10 mg/mL de solução). Para a albumina, $E_{1\%280\ nm}$ = 6,7. Embora as proteínas variem em seus conteúdos de Trp, Tyr e Phe, as medidas da absorbância a 280 nm são úteis para a estimativa da concentração de proteínas em solução.

AMINOÁCIDOS NÃO PROTEICOS

Alguns aminoácidos são encontrados nas formas livre ou combinada, mas não em proteínas. A determinação de valores anormais de aminoácidos na urina (aminoacidúria) é útil no diagnóstico clínico (Cap. 19). No plasma, os aminoácidos livres estão presentes numa concentração em torno de 10 a 100 μmol/L, incluindo muitos daqueles que não são encontrados em proteínas. A citrulina, por exemplo, é um importante metabólito da L-arginina e um produto da óxido nítrico sintase, uma enzima que produz óxido nítrico, uma molécula sinalizadora vasoativa importante. A concentração de

aminoácidos na urina é geralmente expressa em μmol/g de creatinina. A creatinina é um aminoácido derivado dos músculos e é excretada em quantidades relativamente constantes por unidade de massa corporal por dia. Assim, a concentração da creatinina na urina, normalmente cerca de 1 mg/mL, pode ser utilizada para corrigir a diluição da urina. O aminoácido mais abundante na urina é a glicina, que está presente numa concentração de 400 a 2.000 μg/g de creatinina.

Aminoácidos polares neutros

Os aminoácidos polares neutros possuem cadeias laterais com grupos hidroxila ou amida. A serina e a treonina contêm grupos hidroxila. Esses aminoácidos são Às vezes encontrados nos sítios ativos de proteínas catalíticas, as enzimas (Cap. 6). A fosforilação reversível de resíduos periféricos de serina e de treonina nas enzimas está também envolvida na regulação do metabolismo energético e no armazenamento de combustível no organismo (Cap. 13). A asparagina e a glutamina possuem cadeias laterais contendo amida. Esses aminoácidos são polares, mas não apresentam carga nas condições fisiológicas. A serina, a treonina e a asparagina constituem os sítios primários de ligação dos açúcares Às proteínas, formando as glicoproteínas (Cap. 26).

Aminoácidos ácidos

A cadeia lateral dos ácidos aspártico e glutâmico contêm ácidos carboxílicos que estão ionizados em pH 7,0. Em consequência, no estado ionizado esses aminoácidos exibem cargas negativas em seus grupos β- e ε-carboxila, respectivamente, sendo chamados nessas condições de aspartato e glutamato.

Aminoácidos básicos

As cadeias laterais da lisina e da arginina estão totalmente protonadas em pH neutro, e, portanto, positivamente carregadas. A lisina contém um grupo amino primário (NH_2) ligado ao carbono ε-terminal da cadeia lateral. O grupo ε-amino da lisina tem pK_a ~ 11. A arginina é o aminoácido mais básico (pK_a ~ 13), e seu grupo guanidina encontra-se como íon guanidino protonado em pH 7,0.

A histidina (pK_a ~ 6) contém um anel imidazólico em sua cadeia lateral e atua como um catalisador ácido-básico geral em muitas enzimas. A forma protonada do imidazol é denominada íon imidazólio.

Aminoácidos contendo enxofre

A cisteína e sua forma oxidada, a cistina, são aminoácidos sulfurados que se caracterizam pela baixa polaridade. A cisteína desempenha um papel importante na estabilização da estrutura da proteína, já que participa da formação de pontes dissulfeto com outros resíduos de cisteína, originando resíduos de cistina, que estabelecem ligações cruzadas nas cadeias proteicas e estabilizam a estrutura da proteína. Duas regiões de uma única cadeia polipeptídica, distantes uma da outra na sequência, podem estar ligadas covalentemente por uma ponte dissulfeto (ponte dissulfeto intracadeia). As pontes dissulfeto também são formadas entre duas cadeias polipeptídicas (ponte dissulfeto intercadeia), formando dímeros proteicos covalentes. Essas pontes podem ser reduzidas por enzimas ou agentes redutores, como o 2-mercaptoetanol e o ditiotreitol, formando resíduos de cisteína. A metionina é o terceiro aminoácido contendo enxofre, e sua cadeia lateral apresenta um grupo metil tioéter apolar.

Prolina, um iminoácido cíclico

A prolina é diferente dos outros aminoácidos, uma vez que o seu anel pirrolidínico da cadeia lateral inclui tanto o grupo α-amino quanto o carbono α. Esse aminoácido força uma curvatura na cadeia polipeptídica, causando, Às vezes, alterações abruptas na direção da cadeia.

Classificação dos aminoácidos em função da polaridade de suas cadeias laterais

A Tabela 2.2 retrata os grupos funcionais dos aminoácidos e sua polaridade (hidrofilia). As cadeias laterais polares podem estar envolvidas na ligação do hidrogênio com a água e com outros grupos polares e estão usualmente localizadas na superfície da proteína. As cadeias laterais hidrofóbicas contribuem para o dobramento da proteína através de interações hidrofóbicas e estão localizadas principalmente no núcleo proteico ou nas superfícies envolvendo interações com outras proteínas.

Tabela 2.2 Resumo dos grupos funcionais dos aminoácidos e suas polaridades.

Aminoácidos	Grupo funcional	Hidrofílico (polar) ou hidrofóbico (apolar)	Exemplos
ácidos	carboxila, –COOH	polar	Asp, Glu
básicos	amina, $-NH_2$	polar	Lys
	imidazol	polar	His
	guanidino	polar	Arg
neutros	glicina, –H	apolar	Gly
	amidas, $-CONH_2$	polar	Asn, Gln
	hidroxila, –OH	polar	Ser, Thr
	sulfidrila, –SH	polar	Cys
alifáticos	hidrocarboneto	apolar	Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro
aromáticos	anéis de C	apolar	Phe, Trp, Tyr

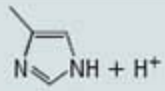
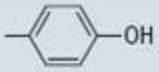
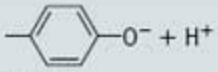
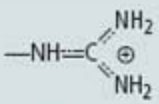
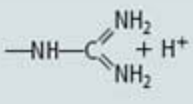
Estado de ionização de um aminoácido

Os aminoácidos são moléculas anfóteras — possuem tanto um grupo básico quanto um grupo ácido. Os ácidos monoamino e monocarboxílicos ionizam-se de maneiras diferentes, dependendo do pH da solução. Em pH 7,0, o *zwitterion* $^{+}H_3N–CH_2–COO^{-}$ é a espécie predominante da glicina em solução, e a molécula é, portanto, eletricamente neutra (carga líquida = zero). Na titulação em pH ácido, o grupo α-amino está protonado e positivamente carregado, produzindo o cátion $^{+}H_3N–CH_2–COOH$, enquanto a titulação com um álcali produz a espécie aniônica $H_2N–CH_2–COO^{-}$.

$$^{+}H_3N—CH_2—COOH \overset{H^+}{\rightleftarrows} {}^{+}H_3N—CH_2—COO^{-} \overset{OH^-}{\rightleftarrows} H_2N—CH_2—COO^{-}$$

A Tabela 2.3 mostra os valores de pK_a para os grupos α-amino e α-carboxila e para as cadeias laterais dos aminoácidos ácidos e básicos. A carga global de uma proteína depende da contribuição dos aminoácidos básicos (carga positiva) e ácidos (carga negativa), mas a carga real varia com o pH da solução. Para entender como as cadeias laterais afetam a carga das proteínas, vale a pena rever a equação de Henderson-Hasselbalch.

Tabela 2.3 Valores de pK_a típicos dos grupos ionizáveis das proteínas. Os valores reais de pK_a podem variar tanto quanta em três unidades de pH, dependendo da temperatura, do tampão, da união com um ligante e, principalmente, dos grupos funcionais vizinhos na proteína.

Grupo	Ácido (forma protonada) (ácido conjugado)	H^+ + Base (forma desprotonada) (base conjugada)	pK_a
resíduo com carboxila terminal (α-carboxila)	–COOH (ácido carboxílico)	$–COO^- + H^+$ (carboxilato)	3,0-5,5
ácido aspártico (β-carboxila)	–COOH	$–COO^- + H^+$	3,9
ácido glutâmico (γ-carboxila)	–COOH	$–COO^- + H^+$	4,3
histidina (imidazol)	 (imidazólio)	 (imidazol)	6,0
aminoterminal (α-amino)	$–NH_3^+$ (amônio)	$–NH_2 + H^+$ (amina)	8,0
cisteína (sulfidrila)	–SH (tiol)	$–S^- + H^+$ (tiolato)	8,3
tirosina (hidroxila fenólica)	 (fenol)	 (fenolato)	10,1
lisina (ε-amino)	$–NH_3^+$	$–NH_2 + H^+$	10,5
arginina (guanidino)	 (guanidínio)	 (guanidino)	12,5

Equação de Henderson-Hasselbalch e pK_a

A dissociação geral de um ácido fraco, como um ácido carboxílico, é dada pela equação:

$$(1)\ HA \rightleftarrows H^+ + A^-$$

onde HA é a forma protonada (ácido conjugado ou forma associada) e A^- é a forma desprotonada (base conjugada ou forma dissociada).

A constante de dissociação (K_a) de um ácido fraco é definida como a constante de equilíbrio da reação de dissociação do ácido (1):

$$(2)\ K_a = \frac{[HA][A^-]}{[HA]}$$

A concentração do íon hidrogênio $[H^+]$ de uma solução de um ácido fraco pode então ser calculada como mostrado a seguir. A equação 2 pode sofrer rearranjo:

$$(3)\ [H^+] = K_a \times \frac{[HA]}{[A^-]}$$

A equação 3 pode ser expressa em função do logaritmo negativo:

$$(4)\ -\log [H^+] = -\log K_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Como o pH é o logaritmo negativo da $[H^+]$, isto é, $-\log[H^+]$ e pK_a é igual ao logaritmo negativo da constante de dissociação de um ácido fraco, isto é, $-\log K_a$, a equação de Henderson-Hasselbalch (5) pode ser desenvolvida e utilizada na análise de sistemas de equilíbrio ácido-básico:

$$(5)\ pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Para uma base fraca, como uma amina, a reação de dissociação pode ser escrita como:

$$(6)\ RNH_3^+ \rightleftarrows H^+ + RNH_2$$

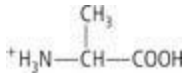
e a equação de Henderson-Hasselbalch torna-se:

$$(7)\ pH = pK_a + \log \frac{[RNH_2]}{[RNH_3^+]}$$

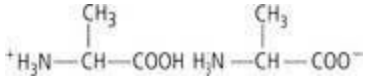
A partir das equações 5 e 7, torna-se evidente que o grau de protonação dos grupos funcionais

ácidos e básicos e, portanto, a carga líquida, variará com o pK_a do grupo funcional e com o pH da solução. Para a alanina, que possui dois grupos funcionais com pK_a = 2,4 e 9,8, respectivamente (Fig. 2.4), a carga líquida varia com o pH, de +1 a −1. Em um valor de pH intermediário entre pK_{a1} e pK_{a2}, a alanina tem carga líquida zero. Esse pH é chamado de ponto isoelétrico, pI (Fig. 2.4).

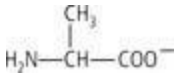
Fig. 2.4 Titulação de um aminoácido. A curva mostra o número de equivalentes de NaOH consumidos pela alanina durante a titulação da solução de pH 0 até pH 12. A alanina contém dois grupos ionizáveis: um grupo α-carboxila e um grupo α-amino. Conforme a NaOH é adicionada, esses dois grupos são titulados. O pK_a do grupo α-COOH é 2,4, enquanto o pK_a do grupo α-NH_3^+ é 9,8. Em pH muito baixo, a espécie iônica predominante da alanina é a forma totalmente protonada:



No ponto médio do primeiro estágio de titulação (pH 2,4), estão presentes concentrações equimolares das espécies doadora de próton e aceptora de próton, fornecendo bom poder de tamponamento.

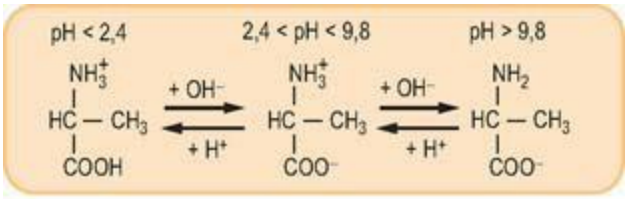


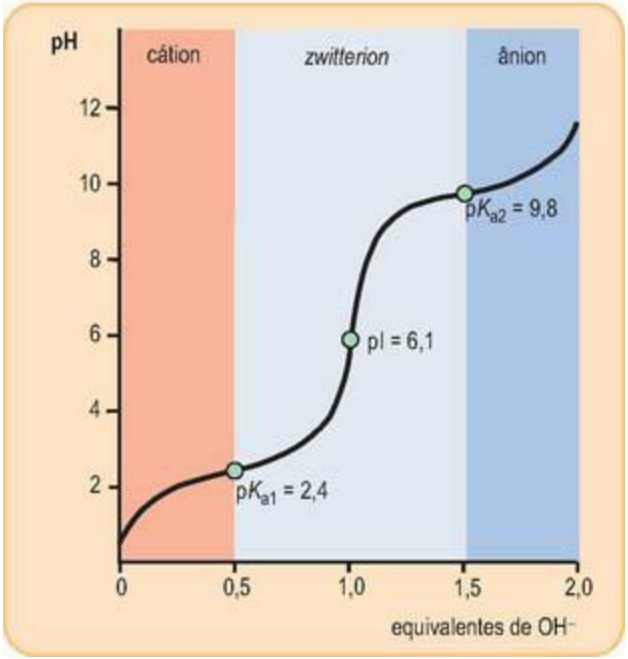
O segundo estágio de titulação corresponde à remoção do próton do grupo –NH_3^+ da alanina. O pH do ponto médio desse estágio é 9,8, igual ao pK_a para o grupo –NH_3^+. A titulação está completa num valor de pH de aproximadamente 12, no qual a forma predominante de alanina é:



O pH no qual a molécula não apresenta carga líquida é conhecido como seu ponto isoelétrico, pI. Para a alanina é calculado como:

$$pI = \left[\frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2}\right] = \left[\frac{2,4 + 9,8}{2}\right] = \frac{12,2}{2} = 6,1$$


pH < 2,4
2,4 < pH < 9,8
pH > 9,8
NH3+
HC — CH3
COOH
+ OH−
+ H+
NH3+
HC — CH3
COO−
+ OH−
+ H+
NH2
HC — CH3
COO−


pH
cátion
zwitterion
ânion
12
10
8
6
4
2
pKa2 = 9,8
pI = 6,1
pKa1 = 2,4
0
0,5
1,0
1,5
2,0
equivalentes de OH−

TAMPÕ ES

Os tampões são soluções que minimizam a alteração da [H^+], isto é, do pH, quando há adição de um ácido ou de uma base. Uma solução tampão, contendo um ácido fraco ou uma base fraca e um contraíon, possui capacidade máxima de tamponamento no seu pK_a, isto é, quando as formas ácida e básica estão presentes em concentrações iguais. A forma protonada, ácida, reage com a base adicionada, e a forma básica, desprotonada, neutraliza o ácido que foi adicionado, como mostrado a seguir para uma substância contendo um grupo amina:

$$RNH_3^+ + OH^- \rightleftarrows RNH_2 + H_2O$$
$$RNH_2 + H^+ \rightleftarrows RNH_3^+$$

Uma solução de alanina (Fig. 2.4) apresenta capacidade de tamponamento máximo quando seu pH é igual a 2,4 e 9,8, isto é, no pK_a dos grupos carboxila e amino, respectivamente. Quando dissolvida em água, a alanina transforma-se em um íon dipolar, ou *zwitterion*, no qual o grupo carboxila está desprotonado ($-COO^-$) e o grupo amino está protonado ($-NH_3^+$). O pH da solução é 6,1, que corresponde ao pI, valor intermediário entre o pK_a do grupo amino e do grupo carboxila. A curva de titulação da alanina com NaOH (Fig. 2.4) mostra que a alanina apresenta capacidade mínima de tamponamento no seu pI e capacidade de tamponamento máxima no pH igual ao pK_{a1} ou ao pK_{a2}.

PEPTÍDIOS E PROTEÍNAS

Estrutura primária das proteínas

A estrutura primária das proteínas consiste na sequência linear dos aminoácidos

Nas proteínas, o grupo carboxila de um aminoácido está ligado ao grupo amino do aminoácido seguinte, formando uma ligação amídica (peptídica); uma molécula de água é eliminada durante a reação (Fig. 2.5). As unidades aminoacídicas de uma cadeia peptídica são chamadas de resíduos de aminoácidos. Uma cadeia peptídica formada por três resíduos de aminoácidos é denominada tripeptídio como, por exemplo, a glutationa, na Figura 2.6. Por convenção, o grupo aminoterminal (N-terminal) é considerado o primeiro resíduo da sequência, que é escrita da esquerda para a direita. Ao se escrever uma sequência peptídica, utiliza-se a abreviatura para os aminoácidos composta de três letras ou de uma letra, como: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu ou D-R-V-Y-I-H-P-F-H-L (Tabela 2.1). Esse peptídio exemplificado é a angiotensina, um hormônio peptídico que afeta a pressão sanguínea. O resíduo de aminoácido que possui um grupo amino livre na extremidade do peptídio, o Asp, é denominado aminoácido N-terminal (aminoterminal), enquanto o resíduo que possui um grupo carboxila livre na outra extremidade, a Leu, é chamado de aminoácido C-terminal (carboxila terminal). As proteínas contêm entre 50 e 2.000 resíduos de aminoácidos. A massa molecular média de um resíduo de aminoácido é de cerca de 110 daltons (Da). Portanto, a massa molecular da maioria das proteínas está entre 5.500 e 220.000 Da. A anidrase carbônica I humana, uma enzima que desempenha um papel importante no equilíbrio ácido-básico do sangue (Cap. 24), é uma proteína com massa molecular de 29.000 Da (29 kDa).

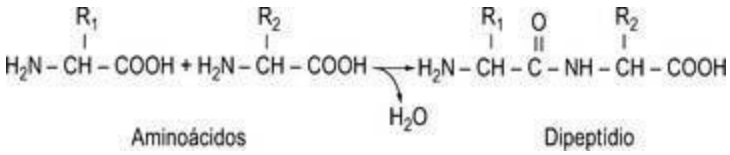


Fig. 2.5 Estrutura de uma ligação peptídica.

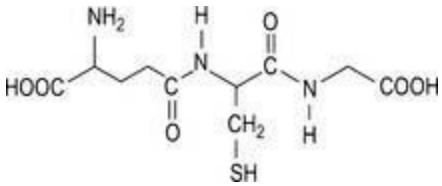


Fig. 2.6 Estrutura da glutationa.

As características da carga e da polaridade de uma cadeia peptídica

A composição dos aminoácidos de uma cadeia peptídica tem um efeito profundo sobre as suas propriedades físicas e químicas. As proteínas ricas em grupamentos amina alifáticos ou aromáticos são relativamente insolúveis em água, sendo mais provável encontrá-los nas membranas celulares. As proteínas ricas em aminoácidos polares são mais solúveis em água. As amidas são compostos neutros, de modo que o esqueleto amídico de uma proteína, formado pelos grupos α-amino e α-carboxila, não contribui para a carga da proteína. Ao contrário, a carga da proteína depende dos grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos. Os aminoácidos que possuem grupos ácidos (Glu, Asp) ou básicos (Lys, His, Arg) em suas cadeias laterais é que conferirão a carga e a capacidade de tamponamento a uma proteína. O equilíbrio entre as cadeias laterais ácidas e básicas de uma proteína determina seu ponto isoelétrico (pI) e sua carga líquida em solução. As proteínas ricas em lisina e arginina são básicas quando em solução e têm uma carga positiva em pH neutro, enquanto as proteínas ácidas, ricas em resíduos de aspartato e glutamato, são ácidas e têm uma carga negativa. Devido aos grupos funcionais de suas cadeias laterais, todas as proteínas tornam-se mais positivas em pH ácido e mais negativas em pH básico. As proteínas constituem um componente importante da capacidade de tamponamento das células sanguíneas e dos líquidos biológicos.



GLUTATIONA

A glutationa (GSH) é um tripeptídio com a sequência γ-glutamil-L-cisteinil-glicina (Fig. 2.6). Quando o grupo tiol da cisteína é oxidado, forma-se o dissulfeto GSSG. A GSH é o principal peptídio presente na célula. No fígado, a concentração de GSH é de ~5 mmol/L. A GSH desempenha um papel importante na manutenção dos resíduos de cisteína das proteínas em suas formas reduzidas (sulfidrila) e nas defesas antioxidantes (Cap. 37). A enzima γ-glutamil transpeptidase está envolvida no metabolismo da glutationa e é um biomarcador plasmático de algumas doenças hepáticas, incluindo o carcinoma hepatocelular e a doença hepática alcoólica.

A estrutura secundária é determinada pelas interações por pontes de hidrogênio entre as carbonilas e os resíduos amídicos do esqueleto peptídico

A estrutura secundária de uma proteína refere-se a uma estrutura local da cadeia polipeptídica. Essa estrutura é determinada por interações por pontes de hidrogênio entre o oxigênio do grupo carbonila de uma ligação peptídica e o hidrogênio amídico de outra ligação peptídica vizinha. Há dois tipos de estrutura secundária: a α-hélice e a folha pregueada β.

A α-hélice

A α-hélice é uma estrutura cilíndrica formada pelo firme enrolamento da cadeia peptídica, apresentando as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos projetadas para fora do eixo da espiral. Cada grupo carbonila de uma amida está ligado através de uma ponte de hidrogênio ao hidrogênio da amida de uma ligação peptídica distante quatro resíduos na mesma cadeia. Há, em média, 3,6 resíduos de aminoácidos por volta da hélice, e a hélice enrola-se para a direita (no sentido horário) em quase todas as proteínas naturais (Fig. 2.7A).

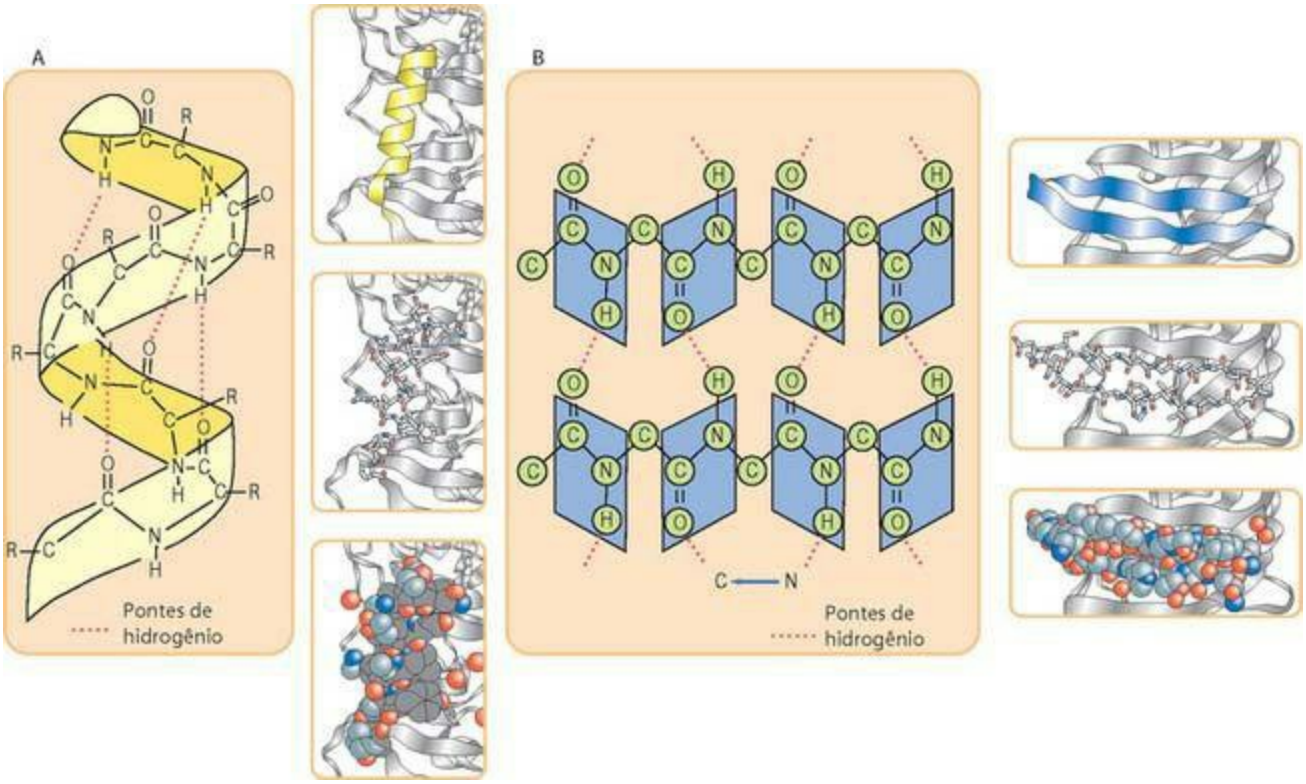


Fig. 2.7 Arranjos ou motivos (motifs) da estrutura secundária das proteínas. (A) Estrutura secundária em α-hélice. As pontes de hidrogênio entre o grupo NH e o grupo C=O das amidas do "esqueleto" proteico estabilizam a α-hélice. Os átomos de hidrogênio dos grupos OH, NH ou SH (doadores de hidrogênio) interagem com os elétrons livres dos átomos aceptores, como O, N ou S. Embora a energia de ligação seja mais baixa do que a das ligações covalentes, elas desempenham um papel fundamental na estabilização das moléculas proteicas. R: grupos laterais dos aminoácidos que se estendem para fora a partir da hélice. A figura mostra os modelos em fita, varetas e bolas e espaço preenchido. (B) Estrutura secundária em folha β paralela. Na conformação β, o esqueleto da cadeia polipeptídica está disposto em uma forma em ziguezague. Quando as cadeias polipeptídicas em ziguezague dispõem-se lado a lado, formam uma estrutura que se assemelha a uma série de pregas. A figura também mostra os modelos em fita, varetas e bolas e espaço preenchido.

Folha pregueada β

Quando as pontes de hidrogênio são formadas entre as ligações peptídicas de cadeias diferentes, as cadeias assumem uma disposição paralela ou antiparalela uma em relação à outra, formando uma estrutura habitualmente denominada folha pregueada β. A folha pregueada β é uma estrutura estendida, diferentemente da estrutura enrolada da α-hélice. É pregueada porque as ligações carbono-carbono (C–C) são tetraédricas e não podem existir em uma configuração planar. Se a cadeia polipeptídica segue na mesma direção, forma-se uma folha β paralela (Fig. 2.7B), mas, se apresenta direções opostas, origina-se uma estrutura antiparalela. A volta β (β-*turn*) ou curvatura β (β-*bend*) refere-se ao segmento do polipeptídio onde ocorre uma inversão abrupta de direção. Resíduos de glicina (Gly) e de prolina (Pro) estão presentes frequentemente nas voltas β na superfície das proteínas globulares.



COLÁGENO

Os defeitos genéticos humanos que envolvem o colágeno ilustram a estreita relação entre a sequência de aminoácidos e a estrutura tridimensional. Os colágenos constituem a família de proteínas mais abundante do corpo dos mamíferos e representam cerca de um terço das proteínas do corpo. Os colágenos são os principais componentes do tecido conjuntivo, como a cartilagem, os tendões, a matriz orgânica dos ossos e a córnea dos olhos.

Comentário. O colágeno contém 35% de Gly, 11% de Ala e 21% de Pro e Hyp (hidroxiprolina). A sequência dos aminoácidos do colágeno geralmente consiste em uma unidade tripeptídica repetitiva, Gly-Xaa-Pro ou Gly-Xaa-Hyp, na qual Xaa pode ser qualquer aminoácido; Hyp = hidroxiprolina. Essa sequência repetitiva adota uma estrutura helicoidal anti-horária com três resíduos por volta. Três dessas hélices enrolam-se entre si no sentido horário. A molécula resultante, composta por três fitas, é denominada tropocolágeno. As moléculas de tropocolágeno autoagrupam-se em fibrilas de colágeno que são mantidas juntas para formar as fibras de colágeno. Existem distúrbios metabólicos e genéticos que resultam de anormalidades do colágeno. O escorbuto, a osteogênese imperfeita (Cap. 28) e a síndrome de Ehlers-Danlos resultam de defeitos na síntese e/ou nas ligações cruzadas do colágeno.

A estrutura terciária resulta do dobramento da cadeia peptídica

A conformação tridimensional, enovelada e biologicamente ativa de uma proteína é denominada estrutura terciária. Essa estrutura reflete a forma global da molécula. A estrutura terciária das proteínas é determinada por cristalografia por raios X e espectroscopia por ressonância nuclear magnética. A conformação dobrada das proteínas que contêm mais de 200 resíduos consiste em várias unidades dobradas menores denominadas domínios.

A estrutura terciária tridimensional de uma proteína é estabilizada por interações entre os grupos funcionais das cadeias laterais: ligações dissulfeto covalentes, pontes de hidrogênio, pontes salinas e interações hidrofóbicas (Fig. 2.8). As cadeias laterais do triptofano e a da arginina atuam como doadoras de hidrogênio, enquanto as cadeias laterais da asparagina, da glutamina, da serina e da treonina podem atuar tanto como doadoras quanto como aceptoras de hidrogênio. A lisina, o ácido aspártico, o ácido glutâmico, a tirosina e a histidina também podem atuar tanto como doadores quanto como aceptores na formação dos pares iônicos (pontes salinas). Dois aminoácidos de cargas opostas, como o glutamato com um grupo γ-carboxila e a lisina com um grupo ε-amino, podem formar uma ponte salina, principalmente na superfície das proteínas (Fig. 2.8).

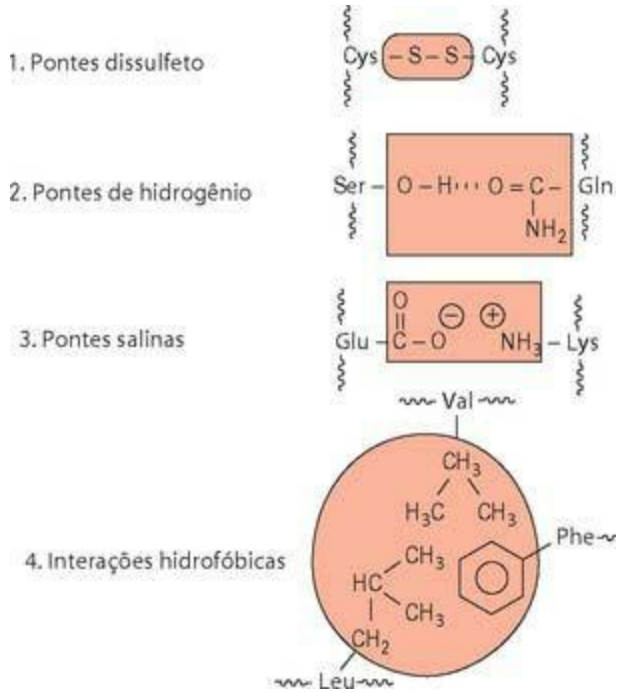


Fig. 2.8 Elementos da estrutura terciária das proteínas. Exemplos de interações entre os grupos laterais dos aminoácidos que contribuem para a estrutura terciária.

Compostos como a ureia e o hidrocloridrato de guanidina frequentemente causam a desnaturação ou a perda das estruturas secundária e terciária quando presentes em altas concentrações, como, por exemplo, 8 mol/L de ureia. Esses reagentes são chamados de agentes desnaturantes ou caotrópicos.

DESLOCAMENTO DO CRISTALINO NA HOMOCISTEINÚRIA (INCIDÊNCIA DE 1 EM 350.000)

A manifestação ocular mais comum da homocistinúria (Cap. 19) é o deslocamento do cristalino, que ocorre por volta dos 10 anos de idade. A fibrilina, encontrada nas fibras que sustentam o cristalino, é rica em resíduos de cisteína. As pontes dissulfeto entre esses resíduos são necessárias para que ocorram ligações cruzadas e a estabilização da proteína e da estrutura do cristalino. A homocisteína, um homólogo da cisteína, é capaz de romper essas ligações por troca de dissulfetos dependentes da homocisteína.

Outro distúrbio relacionado a aminoácido sulfurado e igualmente raro — a deficiência de sulfito oxidase — também está associado ao deslocamento do cristalino causado por um mecanismo similar (geralmente presente no nascimento, com convulsões neonatais refratárias precoces). A síndrome de Marfan, também associada com o deslocamento do cristalino, está relacionada a mutações no gene da fibrilina (Cap. 28).

A estrutura quaternária é formada por interações entre as cadeias peptídicas

A estrutura quaternária é formada por um complexo ou reunião de duas ou mais cadeias peptídicas separadas que são mantidas juntas por interações não covalentes ou, em alguns casos, covalentes. Em geral, a maioria das proteínas com mais de 50 kDa têm mais de uma cadeia e são classificadas como proteínas diméricas, triméricas ou multiméricas. Muitas proteínas formadas por várias subunidades são compostas de diferentes tipos de subunidades funcionais, como as subunidades reguladora e catalítica. A hemoglobina é uma proteína tetramérica (Cap. 5), e a ATPase mitocondrial do coração bovino tem 10 protômeros (Cap. 9). A menor unidade é denominada monômero ou subunidade. A Figura 2.9 mostra a estrutura da proteína dimérica Cu/Zn-superóxido dismutase. A Figura 2.10 apresenta uma visão geral das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária de uma proteína tetramérica.

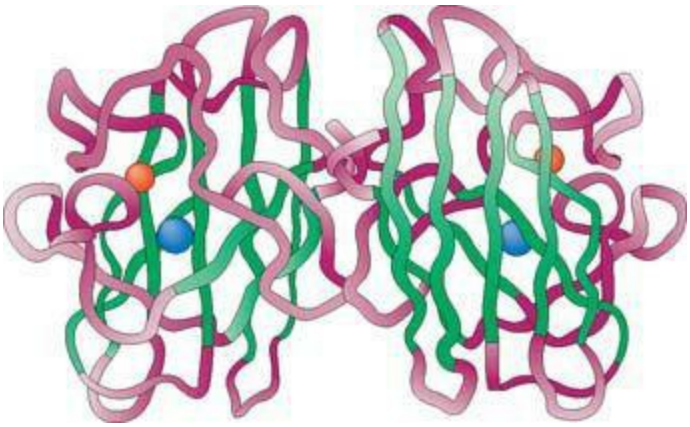


Fig. 2.9 Estrutura tridimensional de uma proteína dimérica. Estrutura quaternária da Cu, Zn-superóxido dismutase do espinafre. A Cu, Zn-superóxido dismutase tem uma estrutura dimérica, com massa molecular de 16.000 Da para cada monômero. Cada subunidade consiste em oito folhas β pregueadas antiparalelas denominadas estrutura em barril β, em analogia aos motivos geométricos encontrados nos tecidos e na cerâmica dos nativos norte-americanos e dos gregos.

Cortesia de Dr. Y. Kitagawa.

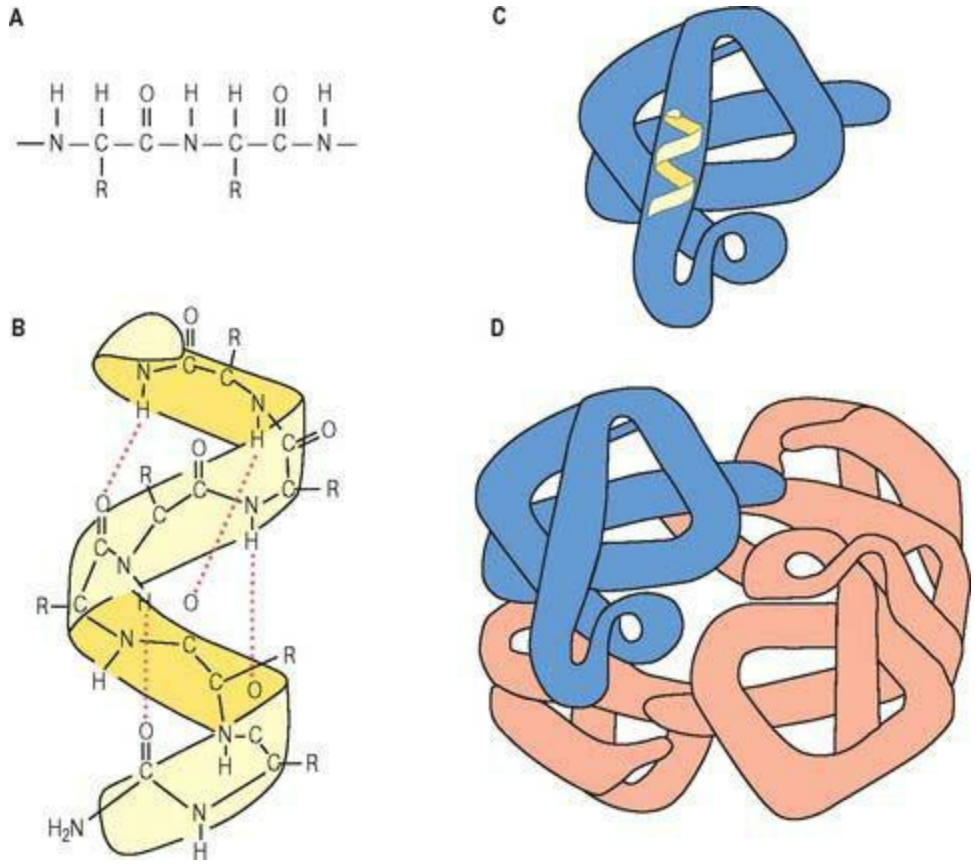


Fig. 2.10 Estruturas primária, secundária, terciária e quaternária. (A) A estrutura primária é composta de uma sequência linear de resíduos de aminoácidos das proteínas. (B) A estrutura secundária indica o arranjo espacial local do esqueleto polipeptídico que produz uma estrutura em α-hélice estendida ou em folha pregueada β, como representado pelo modelo em fita. As ligações de hidrogênio entre o grupo –NH– e o grupo –CO– das amidas do "esqueleto" proteico estabilizam a hélice. (C) A estrutura terciária ilustra a conformação tridimensional de uma subunidade da proteína enquanto a estrutura quaternária (D) mostra a reunião de múltiplas cadeias polipeptídicas formando uma proteína tetramérica, íntegra.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Os procedimentos para a purificação das proteínas apoiam-se em técnicas de separação baseadas na carga, no tamanho, nas propriedades de ligação e na solubilidade. A caracterização completa de uma proteína requer o conhecimento da composição de seus aminoácidos e de suas estruturas primária, secundária e terciária completas e, para as proteínas multiméricas, de sua estrutura quaternária.

A fim de caracterizar uma proteína, é necessário primeiramente purificá-la, separando-a dos outros componentes nas misturas biológicas complexas. A fonte das proteínas é geralmente o sangue ou os tecidos, ou células microbianas como as bactérias e as leveduras. Em primeiro lugar, as células ou os tecidos são rompidos por trituração ou homogeneização em soluções isotônicas tamponadas, comumente em pH fisiológico e a 4 °C para minimizar a desnaturação das proteínas durante a purificação. O "extrato bruto" contendo organelas como núcleos, mitocôndrias, lisossomos, microssomos e frações do citosol, pode então ser fracionado por centrifugação em alta velocidade ou ultracentrifugação. As proteínas que estão fortemente ligadas a outras biomoléculas ou Às membranas podem ser solubilizadas utilizando solventes orgânicos ou detergentes.



MODIFICAÇÕ ES PÕS-TRADUCIONAIS DAS PROTEÍNAS

A maioria das proteínas sofre algum tipo de modificação enzimática após a síntese da cadeia peptídica. As modificações "pós-traducionais" são realizadas por enzimas do retículo endoplasmático, do complexo de Golgi, de grânulos secretórios e do espaço extracelular. As modificações incluem clivagem proteolítica, glicosilação, adição de lipídios e fosforilação. A espectrometria de massas (a seguir) é uma ferramenta poderosa para detectar tais modificações e baseia-se em diferenças na massa molecular (Cap. 33).

Salting-out (fracionamento com sulfato de amônio)

A solubilidade de uma proteína depende da concentração dos sais dissolvidos. A solubilidade pode ser aumentada pela adição de um sal em baixa concentração (*salting-in*) ou diminuída por alta concentração salina (*salting-out*). Quando o sulfato de amônio, um dos sais mais solúveis, é adicionado a uma solução proteica, algumas proteínas precipitam-se em uma dada concentração do sal, enquanto outras não. As imunoglobulinas séricas humanas precipitam-se em $(NH_4)_2SO_4$ saturado a 33-40%, ao passo que a albumina permanece solúvel. A concentração do sulfato de amônio saturado é de aproximadamente 4,1 mol/L. A maioria das proteínas precipita-se em uma solução de $(NH_4)_2SO_4$ saturado a 80%.

Separação com base no tamanho

Diálise e ultrafiltração

Moléculas pequenas, como os sais, podem ser removidas de soluções proteicas por meio de diálise ou por ultrafiltração. A diálise é realizada colocando-se a solução de proteína contendo sal em um tubo formado por uma membrana semipermeável (geralmente uma membrana de nitrocelulose ou colódio). Quando esse tubo é imerso em uma solução tampão diluída, as moléculas pequenas passam através da membrana e as moléculas proteicas grandes ficam retidas no interior do tubo, dependendo do tamanho dos poros da membrana utilizada na diálise. Esse procedimento é particularmente útil para a remoção de $(NH_4)_2SO_4$ ou outros sais durante a purificação das proteínas, uma vez que os sais interferem no processo de purificação das proteínas na cromatografia por troca iônica (a seguir). A Figura 2.11 ilustra a diálise de proteínas.

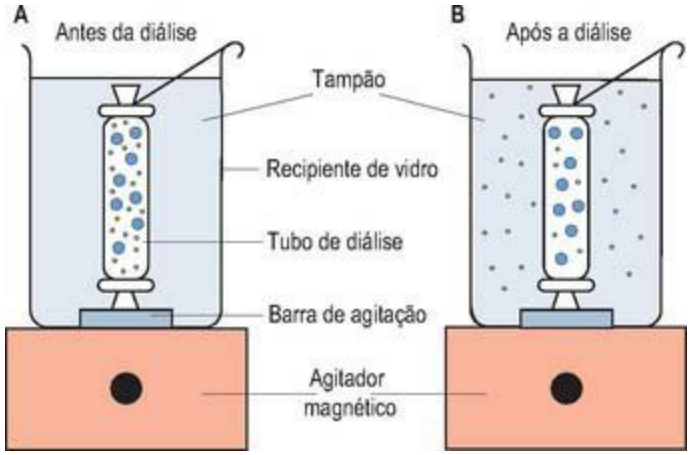


Fig. 2.11 Diálise de proteínas. Proteínas e compostos com baixa massa molecular são separados por diálise com base no tamanho. (A) Uma solução proteica contendo sais é colocada em um tubo de diálise, que é transferido para um béquer, sendo então dialisada, sob agitação magnética, contra um tampão apropriado. (B) A proteína é retida no interior do tubo de diálise, enquanto os sais serão trocados através da membrana. Utilizando grande volume de tampão externo, com substituição ocasional do tampão, a solução proteica será finalmente trocada pela solução de tampão externo.

A ultrafiltração substituiu em grande parte a diálise nos procedimentos de purificação das proteínas. Essa técnica utiliza a pressão para forçar a passagem da solução através de uma membrana semipermeável de tamanho de poro homogêneo e definido. Selecionando-se um filtro com valor de *cut-off* de peso molecular apropriado (tamanho do poro), as membranas permitirão que o solvente e os solutos de baixo peso molecular permeiem a membrana, formando um filtrado, enquanto permanecerão proteínas de peso molecular mais elevado na solução retida. A ultrafiltração pode ser utilizada para concentrar soluções proteicas ou para realizar a diálise com uma substituição contínua do tampão presente no compartimento de retenção.

Filtração em gel (peneiramento molecular)

A cromatografia por filtração em gel, ou por permeação em gel, utiliza uma coluna de polímeros insolúveis, mas altamente hidratados, como as dextranas, a agarose ou a poliacrilamida. A cromatografia por filtração em gel depende da migração diferencial dos solutos dissolvidos através dos géis que possuem poros de tamanhos definidos. Essa técnica é utilizada frequentemente para a purificação de proteínas e na dessalinização de soluções proteicas. A Figura 2.12 descreve o princípio da filtração em gel. Há, no mercado, géis feitos com esferas de polímeros de carboidratos denominados dextranas (série Sephadex), poliacrilamida (série Bio-Gel P) e agarose (série Sepharose), respectivamente. Os géis variam quanto ao tamanho do poro e pode-se escolher o material para filtração em gel de acordo com o intervalo de fracionamento de peso molecular desejado.

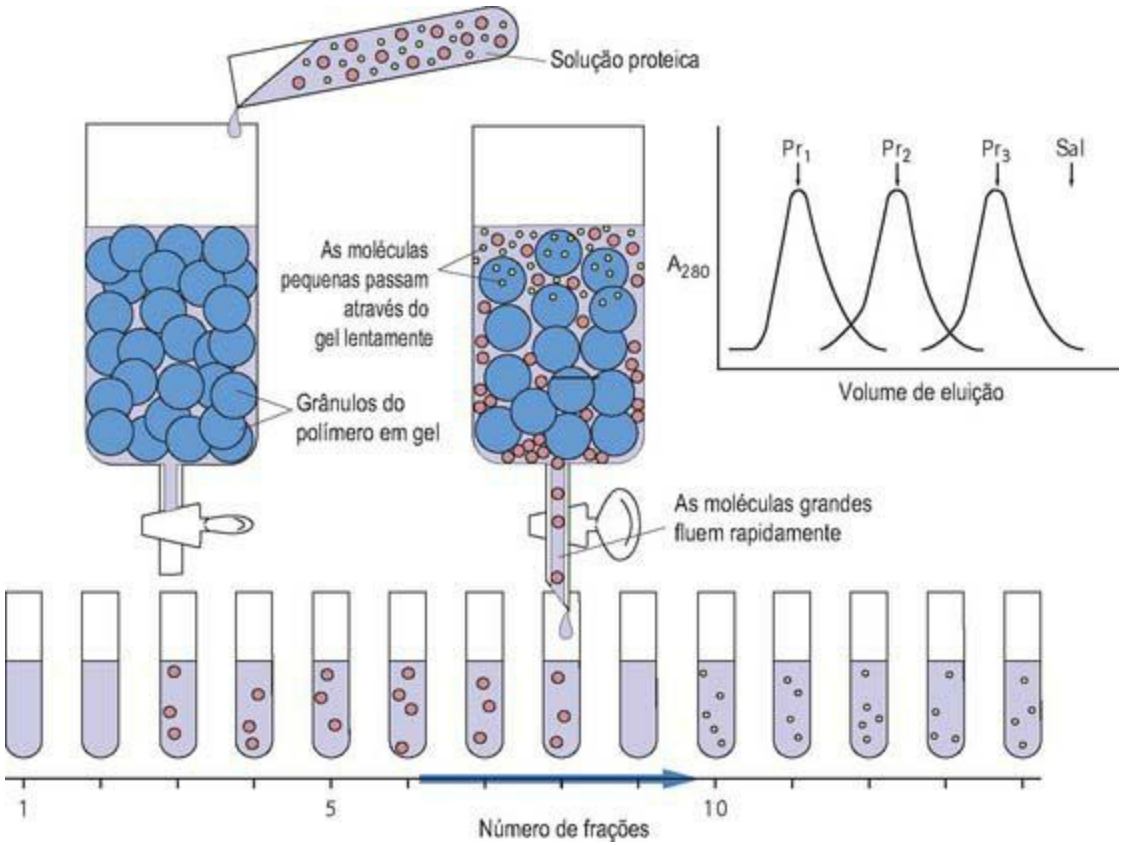


Fig. 2.12 Fracionamento de proteínas com base no tamanho: cromatografia de proteínas por filtração em gel. Proteínas com tamanhos moleculares diferentes são separadas por meio da filtração em gel com

Separação com base na carga: cromatografia por troca iônica

Quando um íon ou uma molécula com uma ou mais cargas positivas é trocado por outro componente carregado positivamente e ligado a uma fase imobilizada carregada negativamente, o processo é denominado troca catiônica. O processo inverso é chamado de troca aniônica. O trocador de cátions, a carboximetilcelulose ($O–CH_2–COO^-$), e o trocador de ânions, a dietilaminoetil (DEAE) celulose ($–O–C_2H_4–NH^+[C_2H_5]_2$), são utilizados frequentemente para a purificação de proteínas. Suponha a purificação de uma mistura proteica que contém albumina e imunoglobulina. Em pH 7,5, a albumina, que tem um pI de 4,8, está com carga negativa; a imunoglobulina, que tem um pI ~ 8, apresenta carga positiva. Se a mistura for aplicada em uma coluna com DEAE celulose, equilibrada em pH 7,0, a albumina aderirá Às cargas positivas da coluna, ao passo que a imunoglobulina passará através dela. A Figura 2.13 ilustra o princípio da cromatografia por troca iônica. Como na cromatografia por permeação em gel, as proteínas podem ser separadas umas das outras com base nas pequenas diferenças entre seus valores de pI. As proteínas adsorvidas são comumente eluídas utilizando-se um gradiente formado por duas ou mais soluções com diferentes valores de pH e/ou concentração salina. Dessa maneira, as proteínas são gradativamente eluídas da coluna e são bem resolvidas com base em seus valores de pI.

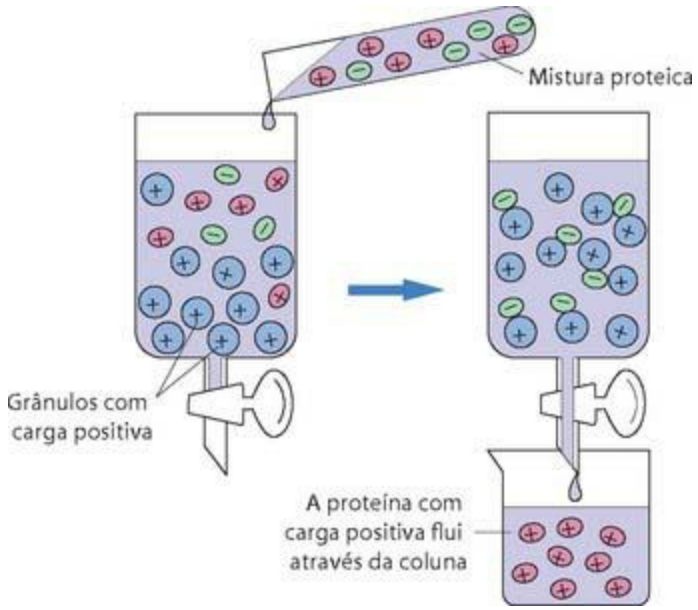


Fig. 2.13 Fracionamento de proteínas com base na carga elétrica: cromatografia por troca iônica. Misturas de proteínas podem ser separadas por meio da cromatografia por troca iônica de acordo com suas cargas líquidas. Os grânulos que apresentam grupos com carga positiva fixados são denominados trocadores de ânions, enquanto aqueles dotados de carga negativa são trocadores de cátions. A figura representa uma coluna trocadora de ânions. A proteína com carga negativa liga-se aos grânulos com carga positiva, e a proteína com carga positiva flui através da coluna.

Cromatografia por afinidade

A cromatografia por afinidade é um método prático e específico para a purificação de proteínas. A matriz porosa da coluna de cromatografia é derivatizada com um ligante que interage, ou se liga, a uma proteína específica de uma mistura complexa. A proteína de interesse será ligada seletiva e especificamente ao ligante, enquanto as outras fluem através da coluna. A proteína ligada pode, então, ser eluída da coluna por meio de uma alta concentração salina, desnaturação leve ou com uma forma solúvel do ligante ou de análogos do ligante (Cap. 6).

Determinação da pureza e do peso molecular de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A eletroforese pode ser utilizada na separação de uma ampla variedade de moléculas carregadas, incluindo aminoácidos, polipeptídios, proteínas e DNA. Quando uma corrente é aplicada Às moléculas em tampões diluídos, aquelas com carga líquida negativa no pH selecionado migram em direção ao anodo e aquelas com carga líquida positiva migram para o catodo. Geralmente utiliza-se um suporte poroso, como papel, acetato de celulose ou gel polimérico, para minimizar a difusão e a convecção.

Como na cromatografia, a eletroforese pode ser utilizada para o fracionamento preparativo de proteínas em pH fisiológico. Proteínas solúveis diferentes movem-se com velocidades diferentes no campo elétrico, dependendo da relação carga/massa de cada proteína. Um detergente desnaturante, o dodecil sulfato de sódio (SDS), é geralmente utilizado no sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para separar e diferenciar subunidades proteicas de acordo com o peso molecular. A amostra proteica é geralmente tratada com SDS e com um reagente tiólico, como o β-mercaptoetanol, para reduzir as pontes dissulfeto. Como a ligação do SDS é proporcional ao comprimento da cadeia peptídica, cada molécula proteica tem a mesma relação massa/carga, e a mobilidade relativa da proteína é proporcional à massa molecular da cadeia polipeptídica. A variação do estado das ligações cruzadas do gel de poliacrilamida confere seletividade para proteínas com pesos moleculares diferentes. Uma amostra proteica purificada pode ser facilmente analisada quanto à homogeneidade pelo método da SDS-PAGE com o uso de corantes sensíveis e específicos, como o azul de Coomassie, ou com a técnica de coloração pela prata, como mostrado na Figura 2.14.

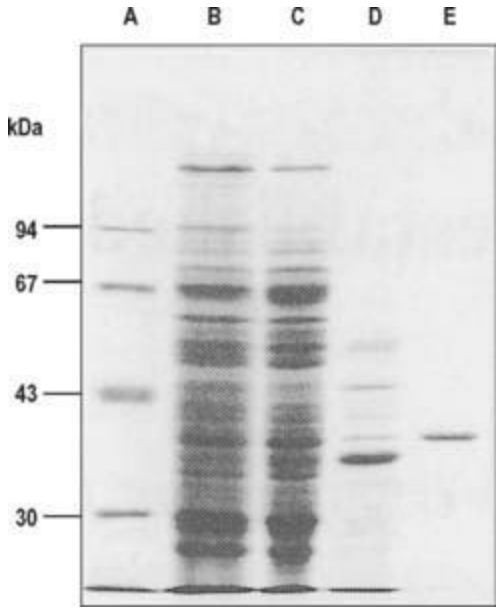


Fig. 2.14 SDS-PAGE. A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio é utilizada para separar proteínas com base nos seus pesos moleculares. As moléculas maiores sofrem um retardo na matriz gelatinosa, enquanto as moléculas menores se movem mais rapidamente. A fileira A contém proteínas-padrão com massas moleculares conhecidas (indicadas em kDa à esquerda na figura). As fileiras B, C, D e E mostram os resultados da análise por SDS-PAGE de uma proteína nos vários estágios da purificação. B = proteína total isolada; C = precipitado com sulfato de amônio; D = fração da cromatografia por permeação em gel; E = proteína purificada a partir de cromatografia por troca iônica.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A HPLC é uma técnica cromatográfica poderosa para a separação de proteínas, peptídios e aminoácidos com alta resolução. O princípio da separação pode ser baseado na carga, no tamanho ou na hidrofobia das proteínas. As colunas estreitas são preenchidas com uma matriz não compressível composta por grânulos pequenos de sílica revestidos com uma camada delgada da fase estacionária. Uma mistura proteica é aplicada na coluna e, em seguida, os componentes são eluídos por eluição isocrática ou através de gradiente. Os eluatos são monitorados por meio de absorção da radiação ultravioleta, índice de refração ou fluorescência. Essa técnica possibilita uma separação com alta resolução.

Focalização isoelétrica (IEF)

A focalização isoelétrica (IEF) é utilizada na separação de proteínas com base em seu pI, conduzindo-se uma eletroforese em um microcanal ou gel contendo um gradiente de pH. A proteína aplicada no sistema estará positiva ou negativamente carregada, dependendo de sua composição em aminoácidos e do pH do meio. Com a aplicação de uma corrente, a proteína se moverá em direção ao anodo ou catodo até encontrar a parte do sistema que corresponde ao seu pI, onde a proteína não tem carga e irá parar de migrar. A IEF é utilizada em conjunto com a SDS-PAGE na eletroforese bidimensional em gel (Fig. 2.15). Essa técnica é particularmente útil para o fracionamento de misturas proteicas complexas na realização da análise proteômica (a seguir).

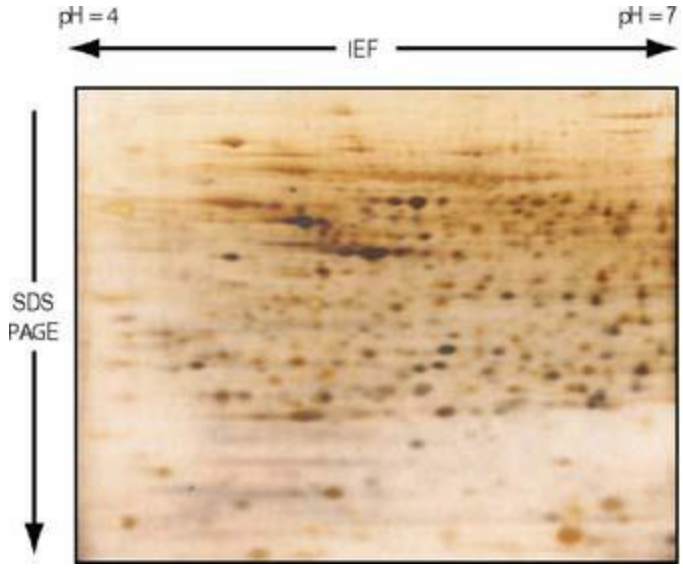


Fig. 2.15 Eletroforese bidimensional em gel. Um extrato bruto de fígado de rato foi inicialmente submetido à focalização isoelétrica (IEF) em gel cilíndrico em uma faixa de pH de 4 a 7. Em seguida, o gel foi colocado horizontalmente sobre uma segunda placa de gel e separado por SDS-PAGE de acordo com a massa molecular. O gel foi corado então com azul de Coomassie.

ANÁLISE DA ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS

A Figura 2.16 mostra um resumo das etapas características da purificação de uma proteína. Uma vez purificada para a determinação da composição de seus aminoácidos, a proteína é submetida à hidrólise, geralmente pela ação do HCl na concentração de 6 mol/L a 110°C, no interior de um tubo lacrado e submetido a vácuo, por um período de 24 a 48 h. Sob essas condições, o triptofano, a cisteína e a maioria da cistina são destruídos, e a glutamina e a asparagina são desaminadas quantitativamente para formar glutamato e aspartato, respectivamente. A recuperação da serina e da treonina é incompleta e diminui à medida que aumenta o tempo de hidrólise. Processos hidrolíticos alternativos podem ser utilizados para quantificar o triptofano, ao passo que a cisteína e a cistina podem ser convertidas a um ácido cisteico estável em meio ácido antes da hidrólise. Após a hidrólise, os aminoácidos livres são separados por um analisador automatizado de aminoácidos utilizando uma coluna de troca iônica ou, após derivatização em pré-coluna com reagentes coloridos ou fluorescentes, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por fase reversa. Os aminoácidos livres fracionados por cromatografia por troca iônica são detectados através de reação com um reagente cromogênico ou fluorogênico, como a ninidrina, o cloreto de dansila, o reagente de Edman (ver a seguir) ou *o*-ftalaldeído. Essas técnicas permitem a determinação de quantidades tão pequenas quanto 1 pmol de cada aminoácido. A Figura 2.17 mostra o padrão de eluição típico dos aminoácidos de uma proteína purificada.



Fig. 2.16 Estratégia para a purificação de proteínas. A purificação de uma proteína envolve uma sequência de etapas na quais as proteínas contaminantes são removidas com base na diferença de tamanho, carga elétrica e hidrofobia. A purificação é monitorada pela SDS-PAGE (Fig. 2.14). A sequência primária da proteína é determinada pela degradação de Edman automatizada sobre os peptídios (Fig. 2.18). A estrutura tridimensional da proteína pode ser determinada pela cristalografia por raios X.

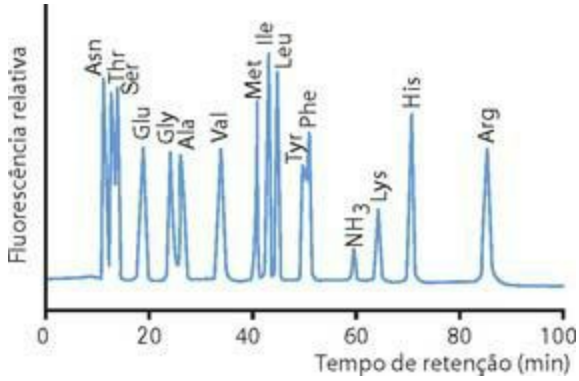


Fig. 2.17 Cromatograma típico obtido a partir de uma análise de aminoácidos realizada por cromatografia por troca catiônica. Um hidrolisado proteico é aplicado em uma coluna trocadora de cátions equilibrada com um tampão diluído em pH ácido (~3,0), no qual todos os aminoácidos estão carregados positivamente. Em seguida, os aminoácidos são eluídos por um gradiente crescente de pH e concentração salina. Os aminoácidos mais aniônicos (ácidos) eluem primeiro, seguidos pelos aminoácidos neutros e básicos. Os aminoácidos são derivatizados por meio de reação pós-coluna com um composto fluorogênico, como o o-ftalaldeído.

Determinação da estrutura primária das proteínas

As informações sobre a sequência primária de uma proteína são essenciais para a compreensão de suas propriedades funcionais, para a identificação da família à qual a proteína pertence, assim como para a caracterização de proteínas mutadas que causam doenças. Uma proteína pode ser clivada primeiramente pela digestão por endoproteases específicas, como a tripsina (Cap. 6), a protease V8 ou a lisil endopeptidase, para a obtenção de fragmentos peptídicos. A tripsina cliva as ligações peptídicas na extremidade *C*-terminal dos resíduos da arginina e da lisina, contanto que o resíduo seguinte não seja a prolina. A lisil endopeptidase também é utilizada com frequência para clivar a extremidade *C*-terminal de lisina. A clivagem por reagentes químicos como o brometo de cianogênio também é útil. O brometo de cianogênio cliva a extremidade *C*-terminal dos resíduos de metionina. Antes da clivagem, as proteínas contendo resíduos de cisteína e cistina são reduzidas pelo 2-mercaptoetanol e, em seguida, são tratadas com iodoacetato para formar resíduos de carboximetilcisteína. Isso evita a formação espontânea de pontes dissulfeto inter- ou intramoleculares durante as análises.

O PROTEOMA

O proteoma é definido como o conjunto completo de proteínas produzidas por um genoma em particular; ocorrem modificações dos proteomas celulares e dos tecidos em resposta a sinalizações hormonais durante o crescimento e devido a estresses ambientais. A proteômica é definida como a comparação qualitativa e quantitativa de proteomas sob diferentes condições. Em uma abordagem para analisar o proteoma de uma célula, as proteínas são extraídas e submetidas à eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE). Cada *spot* proteico selecionado é identificado por coloração, e as proteínas são então extraídas e digeridas com proteases. Os pequenos peptídios retirados desse gel são sequenciados por meio da espectrometria de massas, permitindo a identificação da proteína. A Figura 2.15 mostra uma análise típica de um extrato de fígado de rato. Na eletroforese de fluorescência diferencial em gel bidimensional (DIGE), dois proteomas podem ser comparados através da marcação de suas proteínas com corantes fluorescentes diferentes, por exemplo, vermelho e verde. As proteínas marcadas são misturadas e a seguir fracionadas por 2D-PAGE. As proteínas presentes em ambos os proteomas aparecerão como *spots* amarelos, enquanto as proteínas particulares a cada proteoma estarão vermelhas ou verdes (Cap. 36).

Os peptídios clivados são submetidos em seguida à HPLC por fase reversa para a purificação dos fragmentos peptídicos e depois são sequenciados por um sequenciador de proteínas automatizado, utilizando a técnica de degradação de Edman (Fig. 2.18). A sequência dos peptídios sobrepostos é, então, utilizada para obter a estrutura primária da proteína. A espectrometria de massas é geralmente mais empregada atualmente para a obtenção simultânea da massa molecular e da sequência dos polipeptídios (ver a seguir). Ambas as técnicas podem ser aplicadas diretamente Às proteínas ou aos peptídios recuperados da SDS-PAGE ou da eletroforese bidimensional em gel (IEF + SDS-PAGE). Uma vez que a sequência parcial de aminoácidos é obtida, pode-se determinar a sequência dos nucleotídios do DNA que codifica esse segmento polipeptídico. Após a síntese

química desse DNA, ele pode ser utilizado para identificar e isolar o gene que contém essa sequência de nucleotídios (Cap. 34).

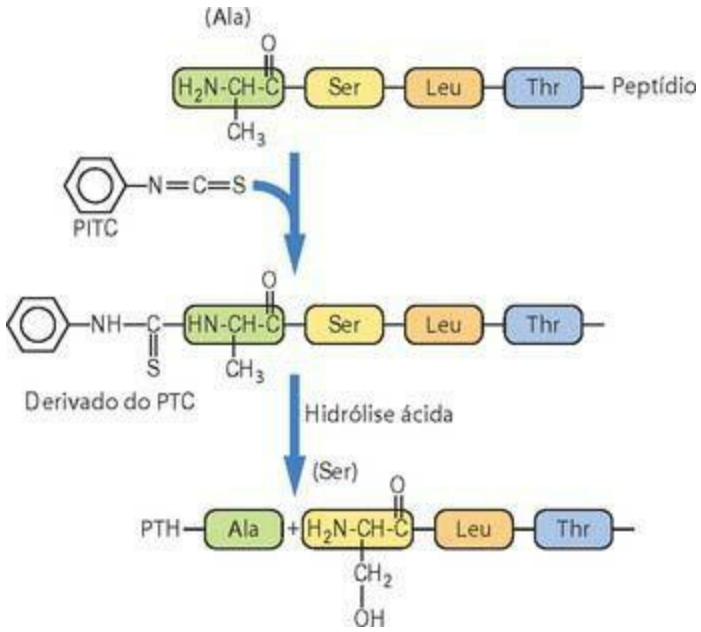


Fig. 2.18 Etapas da degradação de Edman. O método da degradação de Edman remove sequencialmente um resíduo de cada vez da extremidade aminoterminal de um peptídio. Em solução alcalina, o isotiocianato de fenila (PITC) converte o grupo amino N-terminal do peptídio imobilizado em um derivado feniltiocarbamil (PTC-aminoácido). O tratamento ácido remove o primeiro aminoácido na forma de um derivado da feniltio-hidantoína (PTH), que é identificado por HPLC.

A identificação e o sequenciamento da proteína também podem ser realizados empregando espectrometria de massas em *tandem* com fonte de ionização *eletrospray* (HPLC-ESI-MS/MS) (Fig. 2.19). Essa técnica é sensível o suficiente para que proteínas isoladas por eletroforese bidimensional, 2D-PAGE (Fig. 2.15), tipicamente menos que 1 µg de proteína por mancha (*spot*), possam ser digeridas com tripsina *in situ*, e em seguida extraídas do gel e identificadas, com base em sua sequência de aminoácidos. Tanto essa técnica como uma técnica complementar denominada espectrometria de massas por tempo de voo com ionização de matriz assistida por *laser* (MALDI-TOF) MS/MS (Fig. 2.20), podem ser empregadas para a determinação do peso molecular de proteínas intactas, como para a análise da sequência de peptídios, levando à identificação inequívoca da proteína.

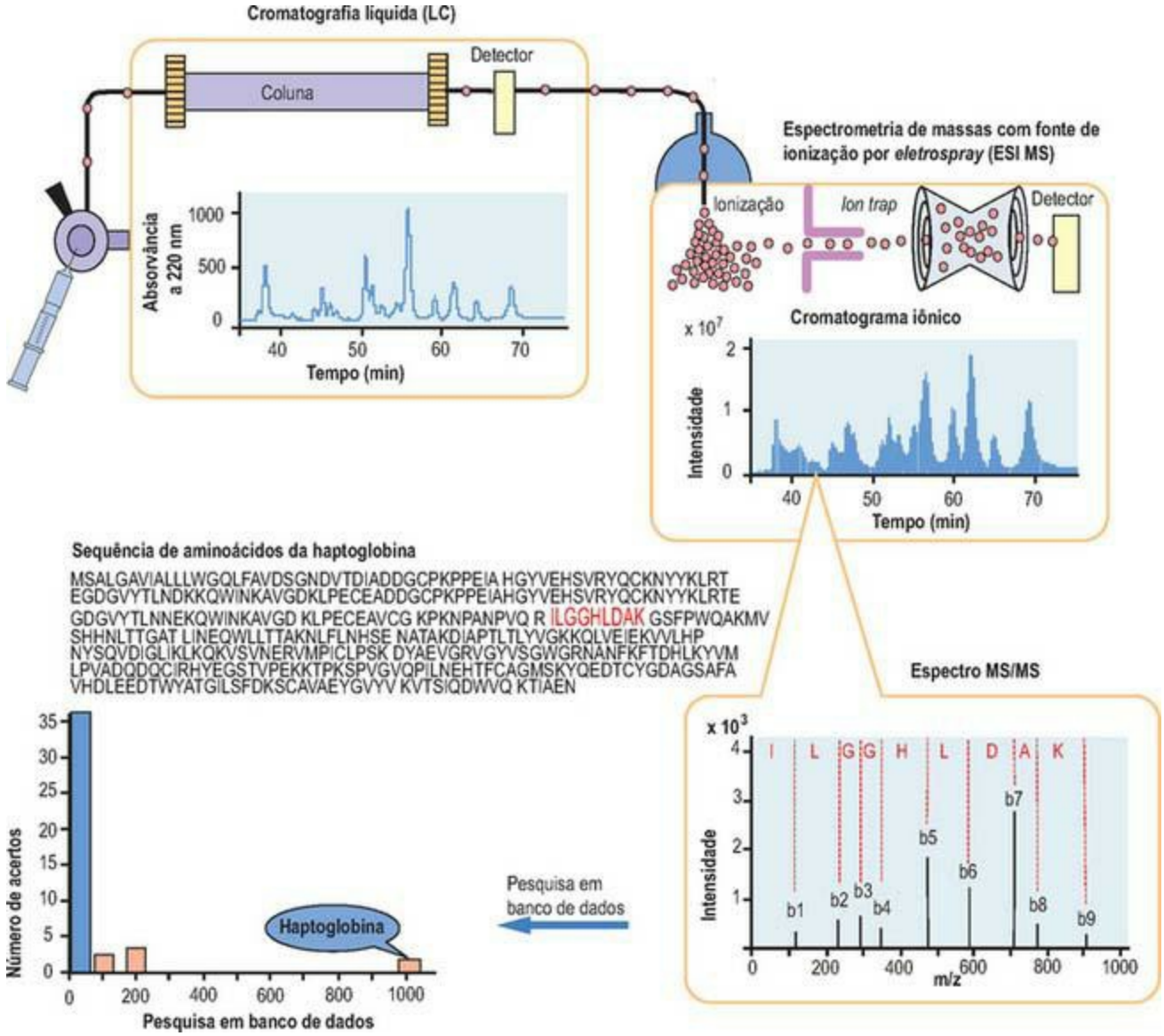


Fig. 2.19 Identificação de proteínas por cromatografia líquida HPLC associada à espectrometria de massas sequencial com fonte de ionização por *eletrospray* (HPLC-ESI-MS/MS). A proteína é digerida com tripsina e os peptídios trípticos são fracionados em um sistema de HPLC por fase reversa utilizando um gradiente crescente de concentração de solvente orgânico em água. O peptídio fracionado é monitorado por detecção na faixa ultravioleta medindo a absorvância da ligação peptídica (~220 nm). Os peptídios (em solução) são injetados diretamente no espectrômetro de massa. A interface ESI tem um sistema líquido de entrada de alto vácuo no qual grande parte do solvente é evaporada rapidamente e uma voltagem é aplicada para ionizar os peptídios. Os íons dos peptídios são enriquecidos em um sistema de captura de íons (*ion* trap) e então extraídos de acordo com a sua massa molecular (m/z = massa/carga relativa). Eles são fragmentados por colisão com moléculas de um gás e os fragmentos são posteriormente analisados em um segundo módulo de espectrometria de massas, um processo conhecido como espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS). Como as ligações peptídicas se fragmentam de uma maneira característica, da esquerda para a direita do carbono α, os fragmentos são obtidos com uma diferença de peso molecular de acordo com a sequência de aminoácidos no peptídio. Os íons b mostrados na figura representam a série de fragmentos obtidos durante a clivagem da porção aminoterminal. Uma série complementar de íons y é obtida na fragmentação a partir da porção carboxiterminal. A massa dos peptídios e o padrão de íons fragmentados são analisados a fim de obter a sequência de aminoácidos, que é então comparada com um banco de dados de proteína (*sites* no final do capítulo). No exemplo apresentado, o peptídio é identificado como ILGGHLDAK, que é encontrado em uma molécula de haptoglobina. Para a identificação inequívoca de uma proteína é comumente utilizado mais de um peptídio.

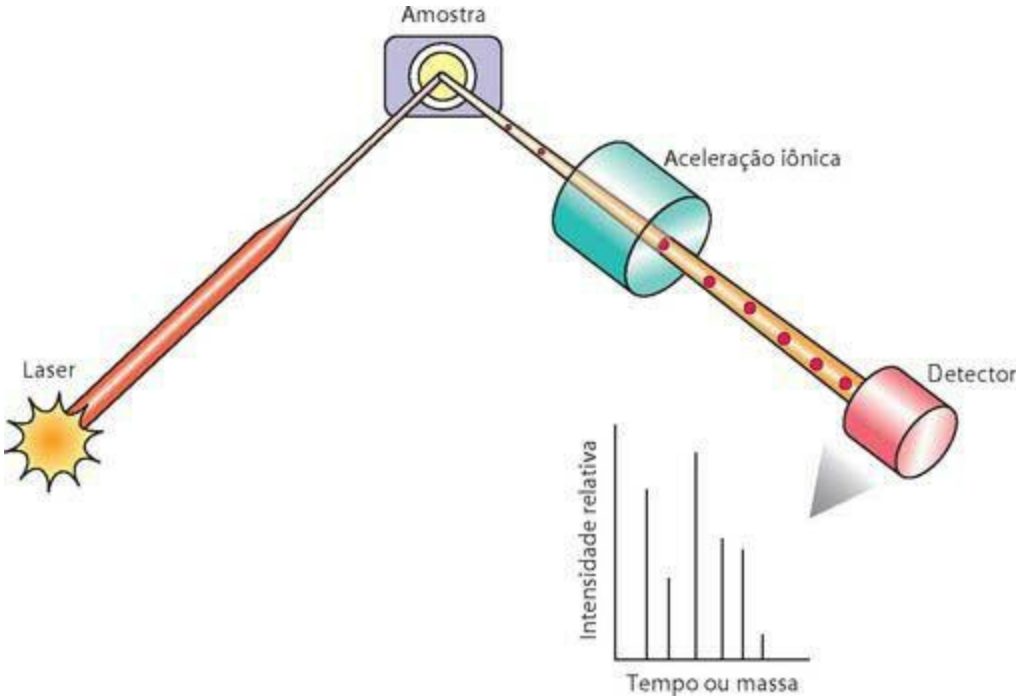


Fig. 2.20 Espectrometria de massas por tempo de voo com ionização e dessorção a *laser* assistida por matriz (MALDI-TOF MS). Proteínas ou peptídios são misturados com um material da matriz e secos sobre a placa da amostra; a matriz é projetada para absorver luz a um comprimento de onda específico do *laser* gerando calor. A proteína ou peptídios são ionizados e dessorvidos da matriz por um pulso de irradiação a *laser* e as partículas ionizadas são aceleradas em um gradiente de tensão a uma velocidade que depende de sua relação massa/carga (m/z). Cada íon atinge o detector após um tempo (tempo de voo — TOF) que está diretamente relacionado à sua massa molecular. Esses íons podem então ser fragmentados para obter a formação da sequência de aminoácidos.

DOBRAMENTO DE PROTEÍNAS E DOENÇAS RELACIONADAS AO DOBRAMENTO DE PROTEÍNAS

Para que as proteínas funcionem adequadamente, elas precisam se dobrar de modo correto. As proteínas evoluíram de tal maneira que um dobramento — o do estado nativo — é mais favorável que todos os outros. Numerosas proteínas auxiliam outras no processo de dobramento. Essas proteínas, denominadas chaperonas, incluem as proteínas do "choque térmico", a HSP 60 e a HSP 70, e a proteína dissulfeto isomerase. A doença relacionada ao dobramento das proteínas é uma doença que está associada à conformação anormal de uma proteína. Essa modificação da conformação proteica ocorre em doenças crônicas relacionadas com a idade, como a doença de Alzheimer, a esclerose lateral amiotrófica e a doença de Parkinson.

Determinação da estrutura tridimensional das proteínas

A cristalografia por raios X e a espectroscopia por RMN são geralmente empregadas na determinação da estrutura tridimensional das proteínas. A cristalografia por raios X consiste na difração dos raios X pelos elétrons dos átomos que constituem a molécula. Contudo, como a difração dos raios X causada por uma única molécula é incomensuravelmente fraca, a proteína precisa estar na forma de um cristal bem organizado, no qual cada molécula apresenta a mesma conformação em uma posição específica e orientação no interior da malha tridimensional. Com base na difração de um feixe colimado de elétrons, a distribuição da densidade eletrônica e, desse modo, a localização dos átomos do cristal, pode ser calculada para determinar a estrutura da proteína. Para a cristalização da proteína, a técnica utilizada com mais frequência é o método da gota suspensa, que utiliza um aparelho simples) o qual permite que uma pequena quantidade de uma solução proteica (geralmente uma gotícula de 10 μL contendo 0,5 a 1 mg/proteína) evapore gradualmente até atingir o ponto de saturação no qual a proteína começa a cristalizar. A espectroscopia por RMN é geralmente empregada para a análise estrutural de pequenos compostos orgânicos, mas a RMN de alto campo também é útil para a determinação da estrutura de uma proteína em solução e complementa as informações obtidas pela cristalografia por raios X.



DOENÇA DE CREUTZFELDT-JACOB

Um homem de 56 anos de idade, criador de gado, apresentava espasmos epilépticos e demência, e recebeu o diagnóstico de doença de Creutzfeldt-Jacob, uma doença humana causada por príons. As doenças causadas por príons, também conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis, são doenças neurodegenerativas que afetam tanto humanos quanto animais. Quando a doença acomete ovinos e caprinos, é denominada *scrapie* ("tremedeira de carneiros"), e quando atinge vacas é chamada de encefalopatia espongiforme bovina (doença da vaca louca). Essas doenças caracterizam-se pelo acúmulo de uma isoforma anormal da proteína codificada pelo hospedeiro, a forma celular da proteína priônica (PrPC), nos cérebros afetados.

Comentário. Os príons parecem ser compostos apenas por moléculas de PrPSc (forma *scrapie* da PrPC), que são confôrmeros anormais da proteína normal, codificada pelo hospedeiro. A PrPC apresenta grande quantidade de α-hélices e é desprovida de folhas pregueadas β, ao passo que a PrPSc possui uma quantidade elevada de folhas pregueadas β. A conversão da PrPC em PrPSc envolve uma profunda mudança conformacional. A progressão das doenças infecciosas causadas por príons parece envolver uma interação entre a PrPC e a PrPSc, que induz uma mudança conformacional da PrPC rica em α-hélices para o confôrmero rico em folhas pregueadas β da PrPSc. A doença causada por príons derivados da PrPSc pode ser de origem genética ou infecciosa. As sequências dos aminoácidos das diferentes PrPCs dos mamíferos são semelhantes, e a conformação da proteína é praticamente a mesma em todas as espécies de mamíferos.

Resumo

Há milhares de proteínas diferentes nas células, e cada proteína tem estrutura e função diferentes. A estrutura de uma proteína de ordem mais elevada é o produto de sua estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. A purificação e a caracterização das proteínas são essenciais para a elucidação de sua estrutura e função. Aproveitando a existência de diferenças no tamanho, na solubilidade, na carga e nas propriedades das ligações com os ligantes, as proteínas podem ser purificadas até a homogeneidade empregando-se várias técnicas cromatográficas e eletroforéticas. A massa molecular e a pureza de uma proteína e a composição de suas subunidades podem ser determinadas pela SDS-PAGE. A estrutura primária pode ser determinada pela hidrólise de uma proteína e pela degradação de Edman automatizada. O deciframento das estruturas primária e tridimensional de uma proteína pela análise por raios X ou pela espectroscopia por RMN leva à compreensão das relações entre a estrutura e a função das proteínas. A espectrometria de massas tem se tornado uma técnica poderosa para a elucidação da estrutura, da modificação química, da função e da homologia das proteínas.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. A análise do sangue, da urina e dos tecidos por espectrometria de massas está sendo utilizada atualmente no diagnóstico clínico. Discuta os méritos dessa técnica com respeito à especificidade, à sensibilidade, ao rendimento e à amplitude da análise, inclusive a análise proteômica com fins diagnósticos.

2. Revise a importância do dobramento incorreto das proteínas e sua deposição nos tecidos nas doenças crônicas relacionadas com a idade.

Leituras sugeridas

Dominguez DC, Lopes R, Torres ML. Proteomics: clinical applications. *Clin Lab Sci*. 2007;20:245-248.

Frydman J. Folding of newly translated proteins *in vivo*: the chaperones. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:603-647.

Imai J, Yashiroda H, Maruya M, Yahara I, Tanaka K. Proteasomes and molecular chaperones: cellular machinery responsible for folding and destruction of unfolded proteins. *Cell Cycle*. 2003;2:585-590.

Kovacs GG, Budka H. Prion diseases: from protein to cell pathology. *Am J Pathol*. 2008;172:555-565.

Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem*. 2005;382:669-678.

Matt P, Fu Z, Ru Q, Van Eyk JE. Biomarker discovery: proteome fractionation and separation in biological samples. *J Physiol Genomics*. 2008;14:12-17.

Shkundina IS, Ter-Avanesyan MD. Prions. *Biochemistry (Moscow)*. 2007;72:1519-1536.

Valentine JS, Hart PJ. Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:3617-3622.

Walsh CT. Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory, 3rd edn. Colorado: Roberts & Co., 2007.

Sites

Aminoácidos Aminoácidos. www.owlnet.rice.edu/~bios301/Bios301/lecture/301_4_2006.pdf.

Estrutura proteica) Estrutura proteica (gráficos, vídeos, geral). www.interscience.wiley.com/8100/legacy/college/boyer/0471661791/structure/jmol_intro/sec_str.htm.

Visualização molecular Visualização molecular. http://molvis.sdsc.edu/index.htm.

Colágeno Colágeno. www.messiah.edu/departments/chemistry/molscilab/Jmol/collagen/chapter1.htm.

Bancos de dados Bancos de dados sobre proteínas: www.pdb.org and http://us.expasy.org

Carboidratos e Lipídios

J.W. Baynes

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a estrutura e a nomenclatura dos carboidratos.
- Identificar os principais carboidratos do corpo humano e de nossa dieta.
- Distinguir açúcares redutores dos não redutores.
- Descrever os vários tipos de ligações glicosídicas nos oligossacarídios e nos polissacarídios.
- Identificar as principais classes de lipídios do corpo humano e de nossa dieta.
- Descrever os tipos de ligações nos lipídios e sua sensibilidade à saponificação.
- Explicar o papel principal dos triglicerídios, fosfolipídios e glicolipídios no organismo.
- Esboçar as características gerais do modelo do mosaico fluido da estrutura das membranas biológicas.

INTRODUÇÃO

Este capítulo descreve a estrutura dos carboidratos e dos lipídios encontrados na dieta e nos tecidos. Essas duas classes dos compostos diferem significativamente em suas propriedades físicas e químicas. Os carboidratos são hidrofílicos; os carboidratos menores, como o açúcar de leite e o açúcar de mesa, são solúveis em solução aquosa, enquanto polímeros como o amido e a celulose formam dispersões coloidais ou são insolúveis. Os lipídios variam no tamanho, mas raramente excedem 2 kDa de massa molecular; são insolúveis na água, mas solúveis em solventes orgànicos. Em contraste com as proteínas, os carboidratos e os lipídios são as principais fontes de energia, e são armazenados no corpo sob a forma de reservas energéticas — glicogànio e triglicerídios (gordura). Tanto os carboidratos quanto os lipídios podem ligar-se às proteínas e desempenhar funções estruturais e regulatórias importantes, que serão abordadas nos próximos capítulos. Este capítulo termina com uma descrição do modelo do mosaico fluido das membranas biológicas, ilustrando como as proteínas, os carboidratos e os lipídios são integrados na estrutura das membranas biológicas que circundam a célula e os compartimentos intracelulares.

CARBOIDRATOS

Nomenclatura e estrutura de açúcares simples

A definição clássica de um carboidrato é a de um aldeído ou uma cetona poli-hidroxilado. Os carboidratos mais simples, possuindo dois grupamentos hidroxila, são o gliceraldeído e a di-hidroxiacetona (Fig. 3.1). Esses açúcares com tràs átomos de carbono são chamados de trioses; o sufixo “ose” designa um açúcar. O gliceraldeído é uma aldose, e a di-hidroxiacetona, uma cetose. Os prefixos e os exemplos de açúcares com cadeia mais longa são mostrados na Tabela 3.1.

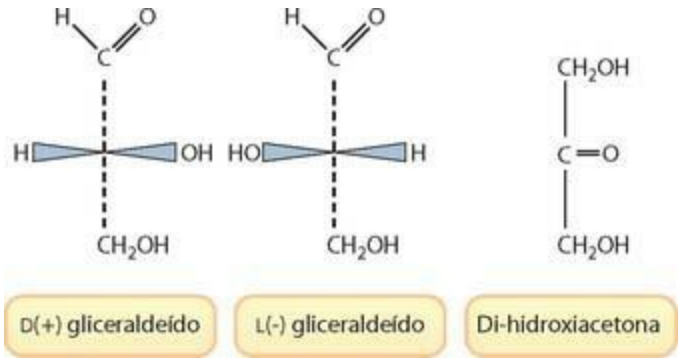


Fig. 3.1 Estrutura das trioses. D e l-gliceraldeído (aldoses) e di-hidroxiacetona (uma cetose).

Tabela 3.1 Classificação dos carboidratos pelo comprimento da cadeia carbonica.

Classificação dos carboidratos pelo comprimento da cadeia carbônica		
Número de carbonos	**Nome**	**Exemplos na biologia humana**
Três	triose	gliceraldeido, di-hidroxiacetona
Quatro	tetrose	eritrose
Cinco	pentose	ribose, ribulose*, xilose, xilulose*, desoxirribose
Seis	hexose	glicose, manose, galactose, fucose, frutose
Sete	heptose	sedo-heptulose*
Oito	octose	nenhum
Nove	no nose	ácido neuramínico (siálico)

* A denominação "ul" Mica que urn açúcar é uma cetose; o nome formal para a frutose seria "gliculose". Da mesma maneira que a frutose, o grupo cetônico está localizado no C-2 do acúcar, e 05 carbonos restantes tern a mesma geometria que 0 acúcar de origem.

A numeração dos carbonos começa da extremidade que contém o grupo funcional aldeído ou cetona. Os açúcares são classificados nas famílias D OU L, tendo como base a configuração em torno do centro assimétrico com numeração mais elevada (Fig. 3.2). Ao contrário do observado para os l-aminoácidos, quase todos os açúcares encontrados no organismo estão na configuração d.

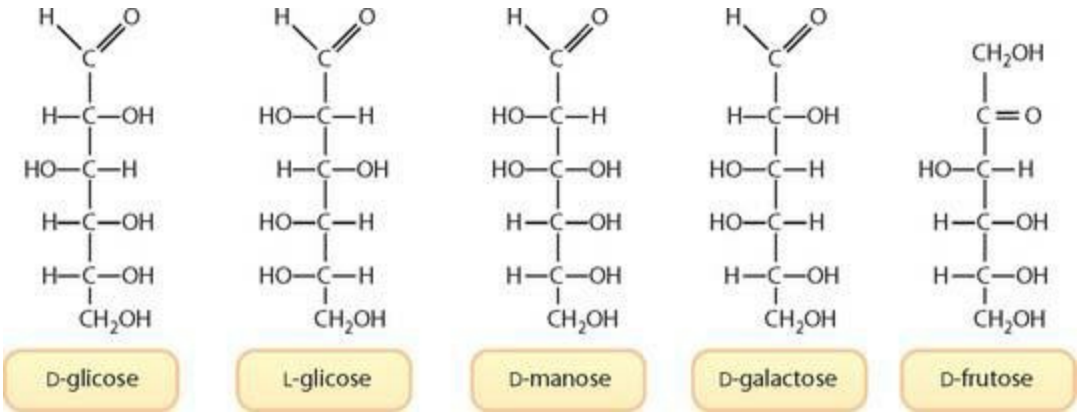


Fig. 3.2 Estrutura das hexoses: D e L-glicose, D-manose, D-galactose e D-frutose. As designações D e L são baseadas na configuração do centro assimétrico de maior numeração, o C-5 no caso das hexoses. Note que a L-glicose é a imagem especular da D-glicose, isto é, a geometria em todos os carbonos assimétricos está invertida. A manose é epímera da glicose no C-2 e a galactose é epímera da glicose no C-4. Essas projeções lineares das estruturas dos carboidratos são conhecidas como projeções de Fischer.

Uma aldo-hexose, como a glicose, contém quatro centros de assimetria, de modo que há 16 (2^4) estereoisômeros possíveis, dependendo de cada um dos quatro carbonos estar na configuração D ou L (Fig. 3.2). Oito dessas aldo-hexoses são D-açúcares. Somente tràs delas são encontradas em quantidades significativas no corpo: a glicose (açúcar do sangue), a manose e a galactose (Fig. 3.2).

Similarmente, há quatro epímeros possíveis das D-ceto-hexoses; a frutose (açúcar das frutas) (Fig. 3.2) é a única ceto-hexose presente em concentração significativa em nossa dieta ou no organismo.

Devido à presença de seus centros assimétricos, os açúcares são compostos opticamente ativos. A rotação do plano da luz polarizada pode ser dextrorrotatória (+) ou levorrotatória (–). Essa designação está também geralmente incluída no nome do açúcar; assim D(+)-glicose ou D(–)-frutose indica que a forma D da glicose é dextrorrotatória enquanto a forma D da frutose é levorrotatória.

Ciclização dos açúcares

As estruturas lineares dos açúcares mostradas na Figura 3.2 inferem que os açúcares classificados como aldoses tàm um resíduo aldeído, quimicamente reativo, facilmente oxidável e eletrofílico; os aldeídos como o formaldeído e o glutaraldeído reagem rapidamente com os grupos amino das proteínas para formar adutos de base de Schiff (imina) e ligações cruzadas durante a fixação dos tecidos. Entretanto, a glicose é relativamente resistente à oxidação e não reage rapidamente com proteínas. Como mostrado na Figura 3.3, em solução aquosa a pH 7,4 e a 37°C, a glicose se encontra principalmente (> 99,99%) na sua conformação de hemiacetal cíclica, inerte e não reativa. De todos os D-açúcares existentes no mundo, a D-glicose ocorre em maior quantidade nessa conformação cíclica, o que a torna menos oxidável e menos reativa com proteínas. Propôs-se que a inércia química relativa da glicose é a razão para sua seleção evolutiva como o açúcar do sangue.

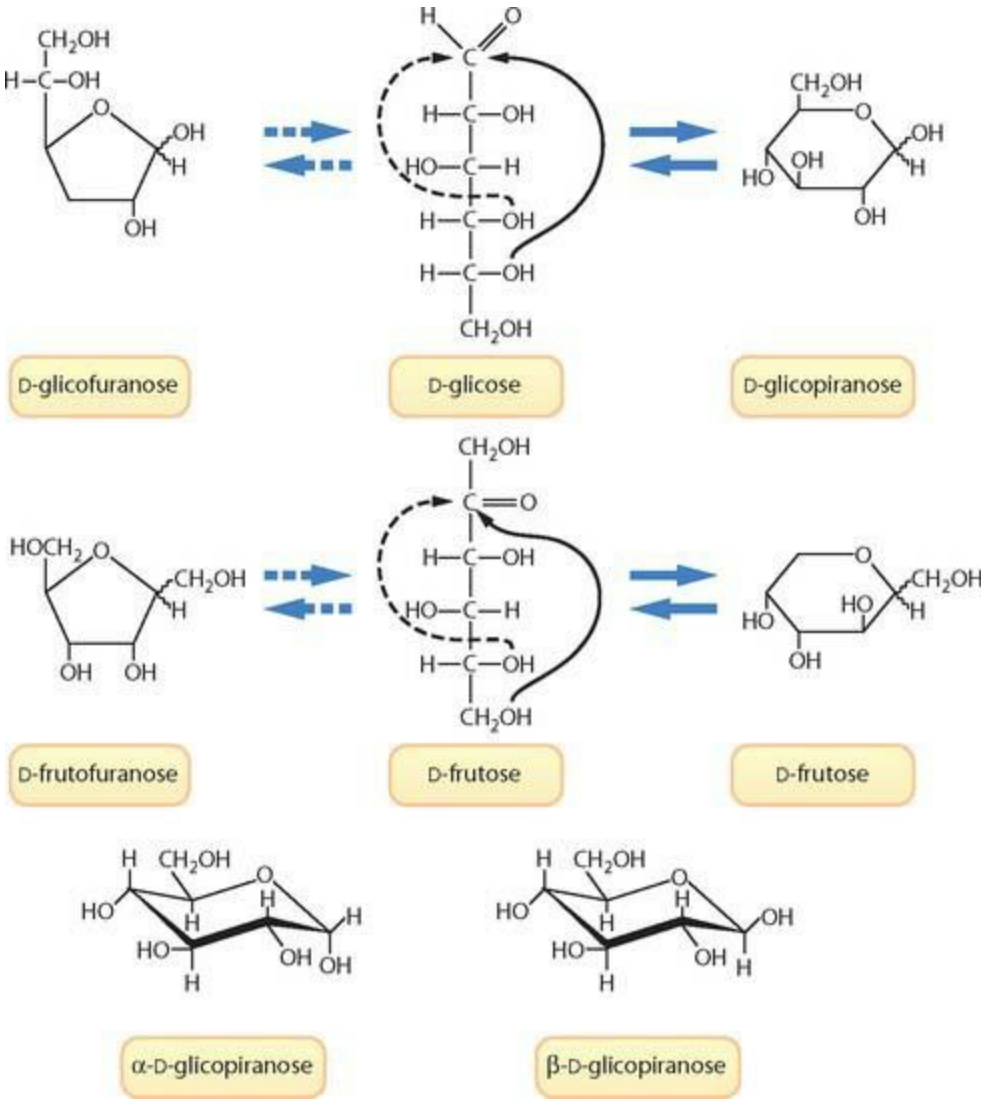


Fig. 3.3 Representação linear e cíclica da glicose e da frutose. (No alto) Há quatro fórmulas cíclicas da glicose em equilíbrio com a fórmula linear: α e β-glicopiranose e α e β-glicofuranose. Mais de 99% da glicose total em solução está sob a forma de piranose. Essas conformações cíclicas são conhecidas como projeções de Haworth; por convenção, os grupos à direita nas projeções de Fischer são mostrados acima do anel, e os grupos à esquerda, abaixo do anel. As ligações contorcidas entre o H e a OH do *C*-1, o carbono anomérico, indicam uma geometria indeterminada e representam o anômero α ou β. (No meio) A forma linear e cíclica da frutose. A proporção piranose:furanose para a frutose em solução aquosa é de ~3:1. A relação varia em função da temperatura, do pH, da concentração salina e de outros fatores. (Embaixo) Representações estereoquímicas das formas em cadeira da α e β-glicopiranose. A estrutura preferencial em solução, a β-glicopiranose, tem todos os grupos hidroxila, incluindo o grupo hidroxila anomérico, em posições

equatoriais em torno do anel, minimizando as interações estéricas.

Quando a glicose se cicliza a um hemiacetal, pode formar uma estrutura em anel denominada furanose ou piranose, nome dado por semelhança com os ésteres cíclicos de carbonos 5 e 6, furano e pirano (Fig. 3.3). Note que a reação de ciclização cria um centro assimétrico novo no *C*-l, chamado de carbono anomérico. A conformação preferencial da glicose é a de β-anômero (~65%), em que o grupo hidroxila no C-l está orientado equatorialmente ao anel. O β-anômero é a forma mais estável da glicose porque todos os grupos hidroxila, que são mais volumosos do que o hidrogànio, estão orientados equatorialmente, no plano do anel. Os anômeros α e β da glicose podem ser isolados na forma pura pela cristalização seletiva a partir de solventes aquosos e orgànicos. Eles possuem rotações ópticas diferentes, mas em solução aquosa as formas se convertem uma na outra durante um período de horas, até atingir o equilíbrio, formando uma mistura contendo uma proporção de 65:35 dos anômeros β:α. Essas diferenças na estrutura podem não parecer importantes, mas na verdade algumas vias metabólicas usam um anômero, mas não o outro, e vice versa. De maneira semelhante, enquanto as conformações frutopiranosídicas constituem as formas principais da frutose em solução aquosa, a maior parte do metabolismo da frutose provém da forma furanosídica.

Além das estruturas básicas de açúcares já discutidas anteriormente, outras estruturas comuns de açúcares são apresentadas na Figura 3.4. Esses açúcares, desoxiaçúcares, aminoaçúcares e os açúcares ácidos são encontrados principalmente nas estruturas dos oligossacarídios ou polissacarídios presentes no corpo; por exemplo, a ribose do RNA e a desoxirribose do DNA, podem estar unidos às proteínas ou aos lipídios para formar glicoconjugados (glicoproteínas ou glicolipídios, respectivamente). A glicose é o único açúcar encontrado em um grau significativo como um açúcar livre (açúcar do sangue) no organismo.

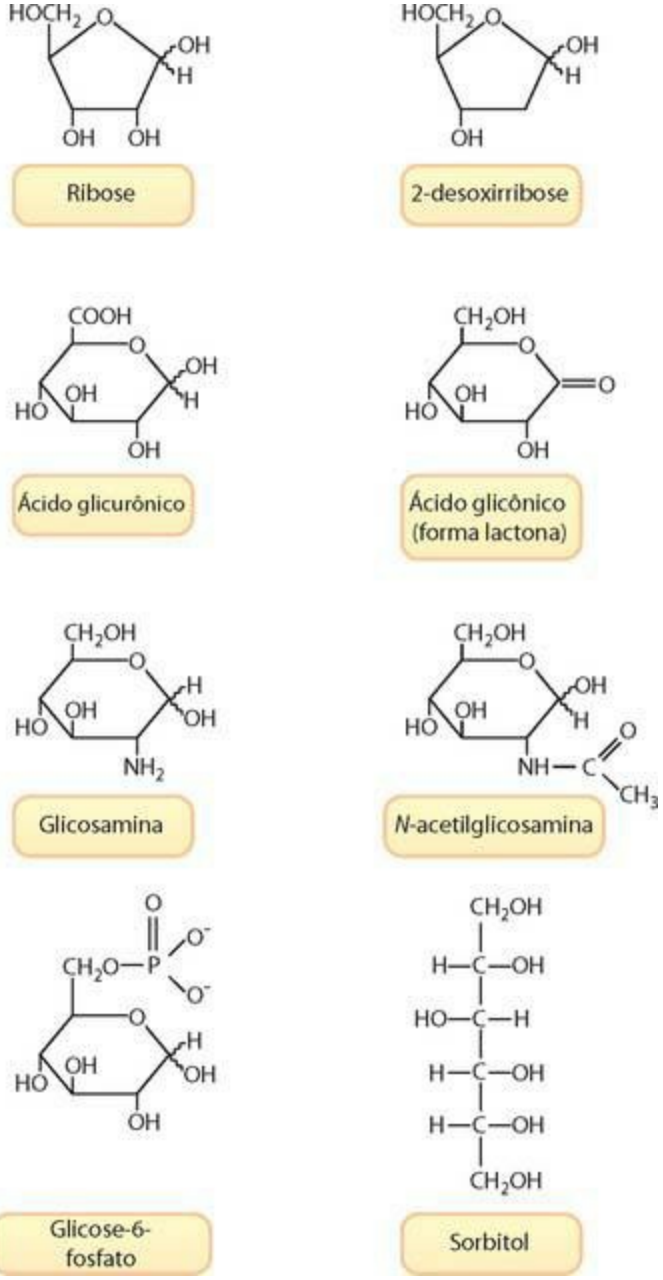


Fig. 3.4 Exemplos de vários tipos de açúcares encontrados nos tecidos humanos. Ribose, o açúcar pentose do ácido ribonucleico (RNA); 2-desoxirribose, a desoxipentose do DNA; ácido glicurônico, um açúcar ácido formado pela oxidação do *C*-6 da glicose; ácido glicônico, um açúcar ácido formado pela oxidação do *C*-1 da glicose, mostrado na forma de δ-lactona; glicosamina, um amino açúcar; *N*-acetilglicosamina, um amino açúcar acetilado; glicose-6-fosfato, um éster fosfato da glicose, um intermediário do metabolismo da glicose; sorbitol, um poliol formado pela redução da glicose.

Dissacarídios, oligossacarídios e polissacarídios

Os carboidratos são geralmente acoplados um ao outro por meio de ligações glicosídicas para formar dissacarídios, trissacarídios, oligossacarídios e polissacarídios. Os sacarídios compostos de um único açúcar são denominados homoglicanas, enquanto os sacarídios com composição complexa são denominados heteroglicanas. O nome das estruturas mais complexas inclui não somente o nome dos açúcares componentes, mas também a conformação do anel dos açúcares, a configuração anomérica da ligação entre os açúcares, o sítio de ligação de um açúcar ao outro e a natureza do átomo envolvido na ligação, geralmente um oxigànio ou ligação *O*-glicosídica, e às vezes um nitrogànio ou ligação *N*-glicosídica. A Figura 3.5 apresenta a estrutura de diversos dissacarídios comuns em nossa dieta: a lactose (açúcar do leite), a sacarose (açúcar de mesa), a maltose e a isomaltose, que são produtos da digestão do amido, a celobiose, que é obtida por hidrólise da celulose, e o ácido hialurônico.

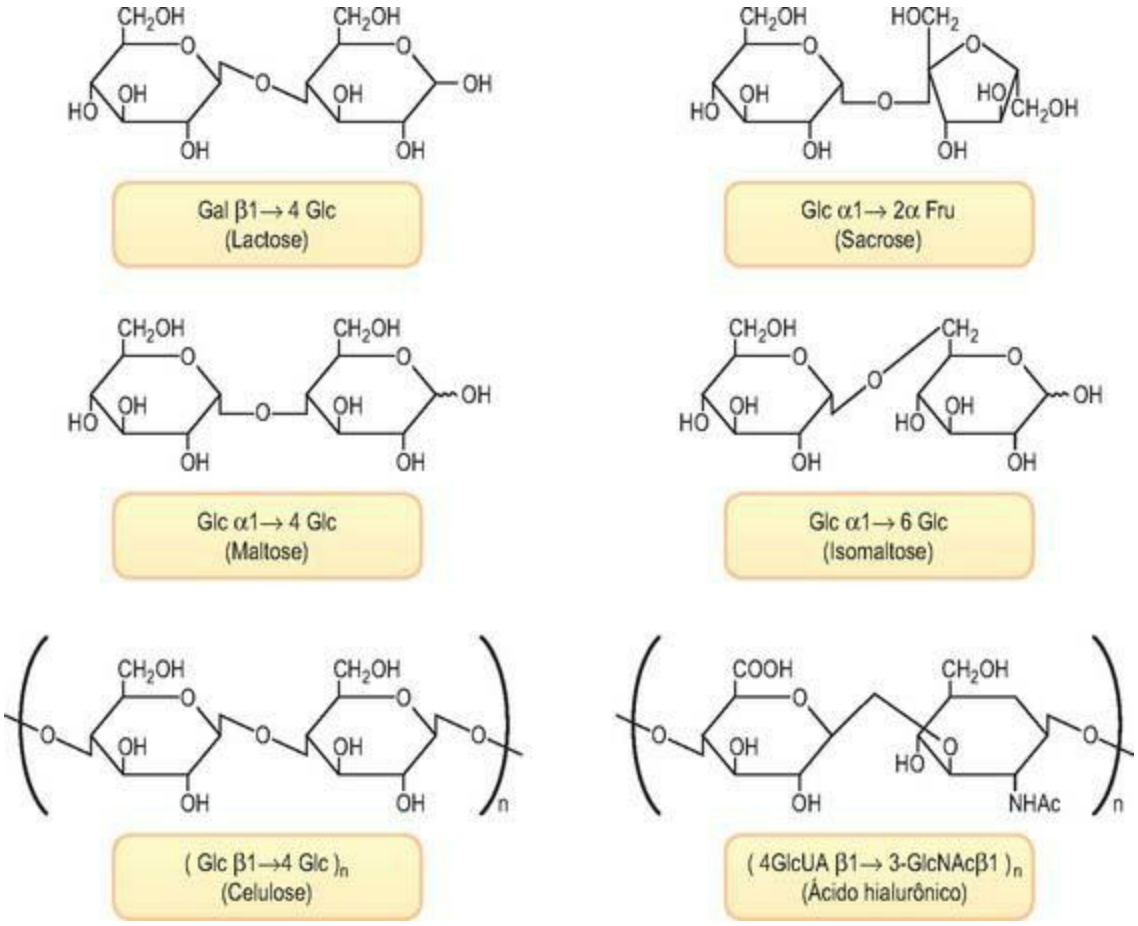


Fig. 3.5 Estruturas de dissacarídios e polissacarídios comuns. Lactose (açúcar do leite); sacarose (açúcar de mesa); maltose e isomaltose, dissacarídios formados pela degradação do amido; e unidades dissacarídicas repetitivas da celulose (da madeira) e do ácido hialurônico (dos discos vertebrais). Fru, frutose; Gal, galactose; Glc, glicose; GlcNAc, *N*-acetilglicosamina; GlcUA, ácido glicurônico.

A INFORMAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLICANAS COMPLEXAS

Os açúcares são unidos entre si através de ligações glicosídicas entre um carbono do hemiacetal

de um açúcar e um grupo hidroxila do outro açúcar. Dois resíduos de glicose podem estar unidos através de diferentes ligações (isto é, α1,2; α1,3; α1,4; α1,6; β1,2; β1,3; β1,4; β1,6; α,α1,1; α,β1,1; β,β1,1), dando origem a 11 dissacarídios diferentes, cada um com propriedades biológicas e químicas diferentes. Dois açúcares diferentes, como a glicose e a galactose, podem estar ligados ou como glicose → galactose ou como galactose → glicose, e esses dois dissacarídios podem ter um total de 20 isômeros diferentes. Em contraste, dois aminoácidos idênticos, como duas alaninas, podem formar somente o dipeptídio alanil-alanina. E dois aminoácidos diferentes, como a alanina e a glicina, podem formar somente dois dipeptídios, alanil-glicina e glicil-alanina. Em consequência, os açúcares têm o potencial de fornecer bastante informação química. Como esboçado nos Capítulos 26 e 27, os carboidratos ligados às proteínas e aos lipídios nas membranas celulares podem servir como sinais de reconhecimento para interações célula-célula e célula-patógeno.

As diferenças na ligação fazem uma grande diferença na bioquímica e na nutrição. Assim, a amilose, um componente do amido, é uma glicana linear com ligações α-1→4, enquanto a celulose é uma glicana linear com ligações β-1→4. Esses dois polissacarídios diferem somente na ligação anomérica entre as subunidades de glicose, mas são moléculas muito diferentes. O amido é solúvel na água, a celulose é insolúvel; o amido é pastoso, a celulose é fibrosa; o amido é digerível, enquanto a celulose não é digerida por seres humanos; o amido é um alimento rico em calorias, enquanto a celulose é uma fibra não digerível.

TESTE DE AÇÚCAR REDUTOR PARA A GLICOSE SANGUÍNEA

Os testes originais para a glicose sanguínea mediam a atividade redutora do sangue. Esses testes funcionavam porque a glicose, na concentração 5 mM, é a principal substância redutora do sangue. Os testes de Fehling e de Benedict utilizam soluções alcalinas de sal cúprico. Com o aquecimento, a glicose decompõe-se oxidativamente, gerando uma mistura complexa de ácidos orgânicos e de aldeídos. A oxidação do açúcar reduz o íon cúprico (cor azul esverdeada) ao íon cuproso (cor laranja-avermelhado) na solução. A intensidade da cor produzida é diretamente proporcional ao conteúdo de glicose na amostra. Os ensaios de açúcar redutor não distinguem a glicose de outros açúcares redutores, como a frutose ou a galactose. Nas doenças relativas ao metabolismo da frutose ou da galactose, como a intolerância hereditária à frutose na galactosemia (Cap. 29), esses testes poderiam fornecer resultados positivos, criando a falsa impressão do diabetes.

LIPÍDIOS

Os lipídios estão localizados principalmente em tràs compartimentos no corpo: plasma, tecido adiposo e membranas biológicas. Esta introdução irá se concentrar na estrutura dos ácidos graxos (a forma mais simples de lipídios, encontrada principalmente no plasma), dos triglicerídios (a forma de armazenamento dos lipídios, encontrada principalmente no tecido adiposo) e de fosfolipídios (a classe principal dos lipídios das membranas em todas as células). Os esteroides, como o colesterol, e os (glico)esfingolipídios serão mencionados no contexto das membranas biológicas, mas esses lipídios e outros, como os eicosanoides, serão comentados em detalhes em capítulos posteriores.

Ácidos graxos

Os ácidos graxos ocorrem na forma livre e como componentes de lipídios mais complexos. Como resumido na Tabela 3.2, são ácidos de alcanos de cadeias lineares longas, contendo mais comumente 16 ou 18 carbonos. Podem ser saturados ou insaturados, estes últimos contendo 1-5 duplas ligações, todos na geometria *cis*. As duplas ligações não são conjugadas, mas são separadas por grupos metileno.

Tabela 3.2 Estrutura e ponto de fusão de ácidos graxos de ocorrência natural. Para os ácidos graxos insaturados, a designação "ω" indica a locali-zação da primeira dupla ligação a partir da extremidade metil da molécula; os A sobrescritos indicam a posição das duplas ligações a partir da extremidade carboxil da molécula. Os ácidos graxos insaturados respondem por aproximadamente dois terços de todos os ácidos graxos no corpo; o oleato e o palmitato respondem por aproximadamente metade e um quarto dos ácidos graxos totais no corpo.

Átomos de carbono		Fórmula química	Nome sistemático	Nome comum	Ponto de fusão (°C)
Ácidos graxos saturados					
12	12:0	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	n-dodecanoico	láurico	44
14	14:0	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	n-tetradecanoico	mirístico	54
16	16:0	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	n-hexadecanoico	palmítico	63
18	18:0	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	n-octadecanoico	esteárico	70
20	20:0	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	n-eicosanoico	araquídico	77
Ácidos graxos insaturados					
16	16:1; ω-6, Δ^9	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$		palmitoleico	−0,5
18	18:1; ω-9, Δ^9	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$		oleico	13
18	18:2; ω-6, $\Delta^{9,12}$	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$		linoleico	−5
18	18:3; ω-3, $\Delta^{9,12,15}$	$CH_3CH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$		linolenico	−11
20	20:4; ω-6, $\Delta^{5,8,11,14}$	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_3COOH$		araquidonico	−50

Os ácidos graxos com uma única dupla ligação são denominados monoinsaturados, enquanto aqueles com duas ou mais duplas ligações são denominados ácidos graxos poli-insaturados. Os ácidos graxos poli-insaturados são classificados comumente em dois grupos, dos ácidos graxos ω-3 e ω-6, dependendo de a primeira dupla ligação aparecer a uma distância de tràs ou seis carbonos a partir do grupo metila terminal. O ponto de fusão dos ácidos graxos, assim como o de lipídios mais complexos, aumenta com o comprimento da cadeia do ácido graxo, porém diminui com o número de duplas ligações. As duplas ligações *cis* provocam uma torção na estrutura linear do ácido graxo, interferindo com o empacotamento justo, consequentemente requerendo uma temperatura mais baixa para congelar-se, isto é, eles possuem um ponto de fusão mais baixo.

MANTEIGA OU MARGARINA?

Há um contínuo debate entre os nutricionistas acerca dos benefícios para a saúde na utilização da manteiga contra o da margarina nos alimentos.

Comentário. A manteiga é rica em colesterol e em triglicerídios, que contàm ácidos graxos

saturados, constituindo fatores de risco da dieta para a aterosclerose. A margarina não contém nenhum colesterol e é mais rica em ácidos graxos insaturados. Entretanto, os ácidos graxos insaturados na margarina são em grande parte ácidos graxos insaturados do tipo trans não naturais formados durante a hidrogenação parcial dos óleos vegetais. Os ácidos graxos trans afetam os lipídios plasmáticos da mesma forma que os ácidos graxos saturados, sugerindo que há riscos comparáveis associados com o consumo da manteiga ou da margarina. A resolução deste assunto é complicada pelo fato de que há várias formas de margarina, por exemplo, de espalhamento suave (cremosa) e em blocos duros, que variam significativamente em seu conteúdo de ácidos graxos trans. Os óleos parcialmente hidrogenados são mais estáveis do que os óleos naturais durante o aquecimento; quando usados para fritura com grande quantidade de óleo, necessitam ser trocados com menor frequància. Apesar da despesa adicional, as indústrias de alimento e de serviços de alimentação mudaram gradualmente para o uso de óleos naturais, ricos em ácidos graxos insaturados e sem ácidos graxos *trans*, para cozinhar e assar.

Triacilgliceróis (triglicerídios)

Os ácidos graxos nos tecidos animais e vegetais estão geralmente esterificados com o glicerol, formando um triacilglicerol (triglicerídio) (Fig. 3.6), como óleos (líquidos) ou gorduras (sólidas). Nos seres humanos, os triglicerídios são armazenados na forma sólida (gordura) no tecido adiposo. Eles são degradados a glicerol e ácidos graxos em resposta aos sinais hormonais, e a seguir liberados no plasma para o metabolismo em outros tecidos, principalmente no músculo e no fígado. A ligação éster dos triglicerídios e de outros glicerolipídios é também prontamente hidrolisada *ex vivo* por uma base forte, como o NaOH, dando origem ao glicerol e aos ácidos graxos livres. Esse processo é conhecido como saponificação; um dos produtos, o sal sódico do ácido graxo, é o sabão.

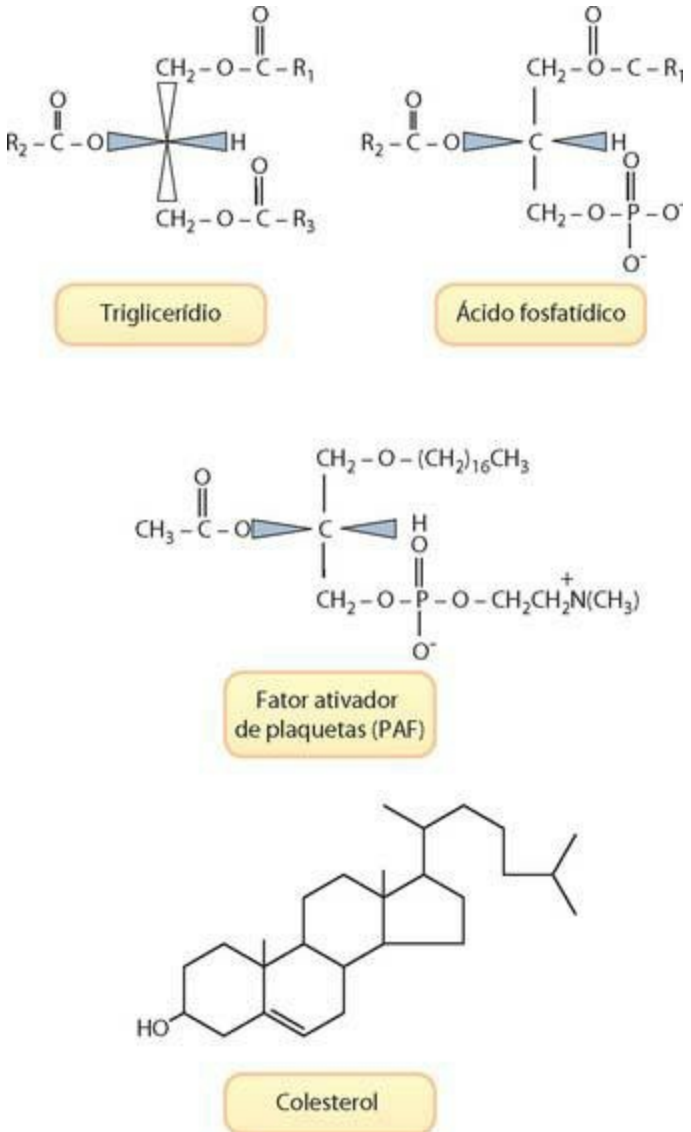


Fig. 3.6 Estrutura de quatro lipídios com funções biológicas significativamente diferentes. Os triglicerídios são as gorduras de armazenamento. O ácido fosfatídico é um precursor metabólico tanto de triglicerídios quanto de fosfolipídios (Fig. 3.7). O colesterol é menos polar do que os fosfolipídios; o grupo hidroxila tende a estar na superfície da membrana, enquanto os sistemas policíclicos se intercalam entre as cadeias do ácido graxo dos fosfolipídios. O fator ativador de plaquetas, um mediador da inflamação, é um fosfolipídio incomum, com um álcool lipídico em vez de um lipídio esterificado na posição *sn*-l, um grupo acetil na posição *sn*-2 e uma fosfatidilcolina esterificada na posição *sn*-3.

O glicerol por si próprio não tem um carbono quiral, mas a numeração é padronizada utilizando

o sistema de numeração estereoquímico (*sn*), que coloca o grupo do hidroxila do C-2 no lado esquerdo; assim, todos os glicerolipídios são derivados do L-glicerol (Fig. 3.6). Os triglicerídios isolados de fontes naturais não são compostos puros, mas misturas de moléculas com composição de diferentes ácidos graxos, por exemplo, 1-palmitoil, 2-oleil, 3-linoleil-L-glicerol, onde a distribuição e o tipo de ácidos graxos variam de molécula para molécula.

Fosfolipídios

Os fosfolipídios são lipídios polares derivados do ácido fosfatídico (1,2-diacil-glicerol-3-fosfato) (Fig. 3.6). Da mesma maneira que os triglicerídios, os glicerofosfolipídios contàm um espectro de ácidos graxos na posição *sn*-1 e *sn*-2, mas a posição *sn*-3 é ocupada pelo fosfato esterificado a um composto amínico. O fosfato atua como uma ponte diéster ligando o diacilglicerídio a um composto nitrogenado polar, mais frequentemente a uma colina, a uma etanolamina ou a uma serina (Fig. 3.7). A fosfatidilcolina (lecitina), por exemplo, contém geralmente o ácido palmítico ou o ácido esteárico em sua posição *sn*-1 e um ácido graxo insaturado com 18 átomos de carbono (p. ex., oleico, linoleico ou linolànico) em sua posição *sn*-2. A fosfatidiletanolamina (cefalina) tem geralmente um ácido graxo poli-insaturado de cadeia mais longa na posição *sn*-2, como o ácido araquidônico. Esses lipídios complexos contribuem com carga para a membrana: a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina são *zwitterions* no pH fisiológico e não tàm nenhuma carga líquida, enquanto a fosfatidilserina e o fosfatidilinositol são aniônicos. Outras estruturas fosfolipídicas com funções especiais serão apresentadas nos próximos capítulos.

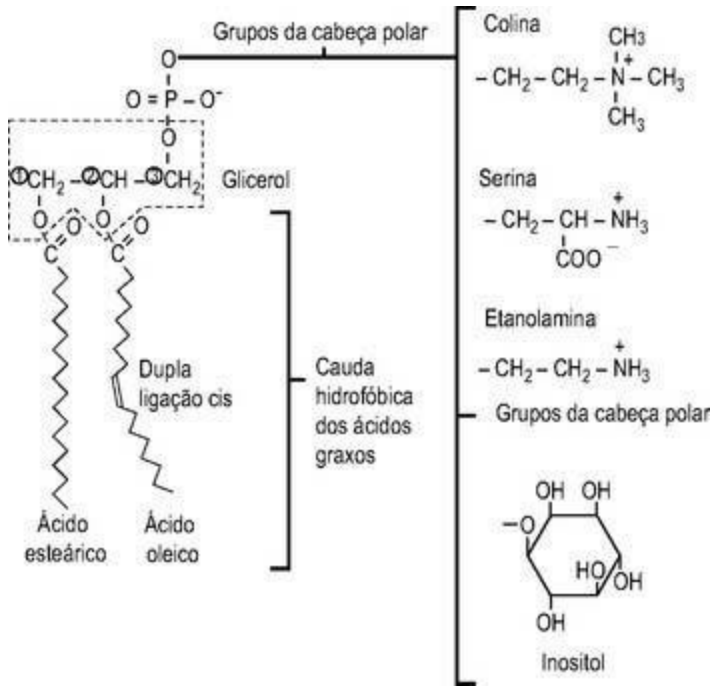


Fig. 3.7 Estrutura dos principais fosfolipídios das membranas da célula animal. Fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol (Cap. 27).

Quando dispersos em solução aquosa, os fosfolipídios formam espontaneamente estruturas lamelares e, sob circunstàncias apropriadas, se organizam em estruturas em bicamadas estendidas — não somente estruturas lamelares, mas também estruturas vesiculares fechadas denominadas lipossomas. O lipossoma é um modelo para a estrutura de uma membrana biológica, um bicamada de lipídios polares com as porções polares expostas ao ambiente aquoso e as cadeias laterais de ácido graxo mergulhadas no interior hidrofóbico da membrana, oleoso. A superfície da membrana lipossômica, como seus componentes fosfolipídios, é uma estrutura maleável, móvel e flexível na temperatura corporal.

As membranas biológicas contàm também outro lipídio anfipático importante, o colesterol, uma molécula hidrofóbica rígida, plana, com um grupo polar hidroxila (Fig. 3.6). O colesterol é encontrado em todas as membranas biológicas e age como um modulador da fluidez da membrana. Em temperaturas mais baixas ele interfere com as associações entre as cadeias de ácidos graxos e aumenta a fluidez, e em temperaturas mais altas tende a limitar a desordem e diminuir a fluidez. Assim, as misturas colesterol-fosfolipídio tàm as propriedades intermediárias entre os estados de gel e de líquido cristalino dos fosfolipídios puros; eles formam estruturas de membrana estáveis porém flexíveis.

FATOR ATIVADOR DE PLAQUETAS E HIPERSENSIBILIDADE

O fator ativador de plaquetas (PAF; Fig. 3.6.) contém um grupo acetil no carbono 2 do glicerol e um grupo alquil éter saturado de 18 carbonos ligado ao grupo hidroxila do carbono l, em vez do ácido graxo de cadeia longa usual da fosfatidilcolina. à o mediador principal de reações de hipersensibilidade, de reações de inflamação aguda e de choque anafilático, e afeta as propriedades de permeabilidade das membranas, aumentando a agregação plaquetária e causando mudanças cardiovasculares e pulmonares, incluindo o edema e a hipotensão. Em pessoas alérgicas, as células envolvidas na resposta imune tornam-se revestidas com moléculas de imunoglobulina E (IgE) que são específicas para um antígeno ou um alérgeno particular, como o pólen ou o veneno de um inseto. Quando esses indivíduos são expostos novamente a esse antígeno, os complexos de antígeno IgE formam-se na superfície das células inflamatórias e ativam a síntese e a liberação do PAF.

ESTRUTURA DAS MEMBRANAS BIOLÀGICAS

As células eucarióticas tàm uma membrana plasmática, assim como membranas intracelulares que definem compartimentos com funções especializadas: as diferenças na composição tanto de proteínas quanto de lipídios na membrana distinguem essas organelas (Tabela 3.3). Além dos principais fosfolipídios descritos na Figura 3.7, outros importantes lipídios de membrana incluem a cardiolipina, os esfingolipídios (esfingomielina e glicolipídios) e o colesterol, que são descritos em detalhe nos próximos capítulos. A cardiolipina (difosfatidil glicerol) é um componente significativo da membrana interna mitocondrial, enquanto a esfingomielina, a fosfatidilserina e o colesterol estão enriquecidos na membrana plasmática (Tabela 3.3). Alguns lipídios estão distribuídos assimetricamente na membrana; por exemplo, a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina estão preferencialmente na face interna, e a fosfatidilcolina e a esfingomielina, na face externa da membrana dos glóbulos vermelhos do sangue. A proporção de proteína em relação ao lipídio difere também entre as várias membranas biológicas, variando de aproximadamente 80% de lipídios (peso seco) na bainha de mielina, que isolam as células nervosas, a aproximadamente 20% na membrana mitocondrial interna. Os lipídios afetam a estrutura da membrana, a atividade de sistemas de transporte e das enzimas da membrana, e a função da membrana nos processos como o reconhecimento celular e a transdução de sinal. A exposição da fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática do eritrócito aumenta a aderància da célula à parede vascular e é um sinal para o reconhecimento do macrófago e fagocitose. Ambos os processos de reconhecimento contribuem, provavelmente, para o processo natural de reciclagem (*turnover*) de glóbulos vermelhos no baço.

Tabela 3.3 Composição fosfolipídica das membranas de organelas de fígado de rato. Esta tabela mostra a composição fosfolipídica (%) de várias membranas de organelas juntamente com a proporção em peso entre fosfolipídios e colesterol e proteínas.

	Mitocôndria	Microssomo	Lisossomo	Membrana plasmática	Membrana nuclear	Membrana de Golgi
Cardiolipina	18	1	1	1	4	1
Fosfatidiletanolamina	35	22	14	23	13	20
Fosfatidilcolina	40	58	40	39	55	50
Fosfatidilinositol	5	10	5	8	10	12
Fosfatidilserina	1	2	2	9	3	6
Ácido fosfatídico	–	1	1	1	2	< 1
Esfingomielina	1	1	20	16	3	8
Fosfolipídios (mg/mg proteína)	0,18	0,37	0,16	0,67	0,50	0,83
Colesterol (mg/mg proteína)	< 0,01	0,01	0,04	0,13	0,04	0,08

O modelo do mosaico fluido

O modelo de estrutura de membrana biológica geralmente aceito é o modelo do mosaico fluido proposto por Singer e Nicolson em 1972. Esse modelo representa a membrana como uma bicamada de fosfolipídios fluida, na qual outros lipídios e proteínas estão embebidos (Fig. 3.8). Como nos lipossomas, os grupos das cabeças polares dos fosfolipídios estão expostos nas superfícies externas da membrana, com as cadeias acilas dos ácidos graxos orientadas para o interior da membrana. Enquanto os lipídios e as proteínas da membrana se movem facilmente na superfície da membrana (difusão lateral), o movimento dos lipídios do tipo "flip-flop" entre os folhetos externo e interno da bicamada ocorre raramente sem a presença da enzima de membrana flipase.

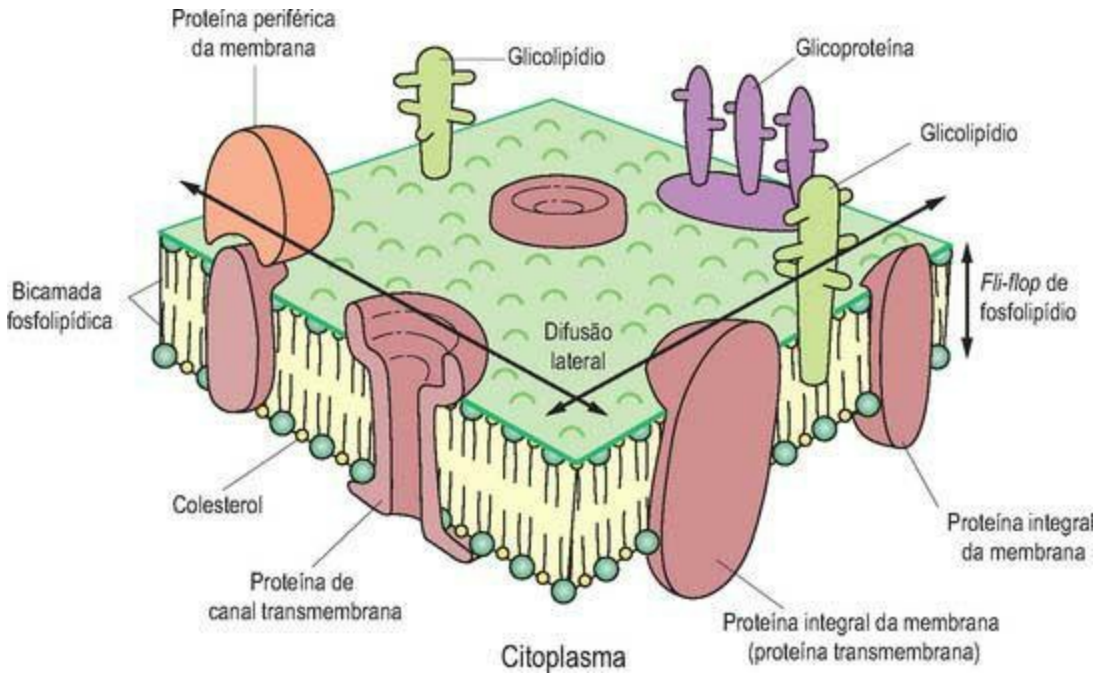


Fig. 3.8 Modelo do mosaico fluido para a membrana plasmática. Nesse modelo, as proteínas estão embebidas em uma bicamada fosfolipídica fluida; algumas estão na superfície (periféricas) e outras atravessam a membrana (transmembrana). Os carboidratos, ligados covalentemente a algumas proteínas e lipídios, não são encontrados em todas as membranas subcelulares, como, por exemplo, a membrana mitocondrial. Na membrana plasmática, eles ficam localizados quase exclusivamente na superfície externa da célula (Cap. 8).

As proteínas da membrana são classificadas como proteínas de membrana integrais (intrínsecas) ou periféricas (extrínsecas). As primeiras estão embebidas profundamente na bicamada lipídica e algumas delas atravessam a membrana diversas vezes (proteínas transmembrana) e possuem segmentos de polipeptídios tanto internos quanto externos que participam de processos regulatórios. Em contraste, as proteínas de membrana periféricas estão ligadas a lipídios da membrana e/ou às proteínas integrais da membrana (Fig. 3.8); elas podem ser removidas da membrana por agentes caotrópicos suaves, como a ureia, ou por tratamento com detergente suave, sem destruir a integridade da membrana. Ao contrário, as proteínas transmembrana podem ser removidas da membrana utilizando somente tratamentos que dissolvem os lipídios da membrana e destroem a integridade da membrana. A maioria dos segmentos transmembrana das proteínas de membrana integrais formam α-hélices. Eles são compostos principalmente de resíduos de aminoácidos com as cadeias laterais apolares — aproximadamente 20 resíduos de aminoácidos formando seis a sete voltas em α-hélice

são suficientes para atravessar uma membrana de uma espessura de 5 nm (50 à). Os domínios transmembrana interagem uns com os outros e com as caudas hidrofóbicas das moléculas de lipídios, formando frequentemente estruturas complexas, como os canais envolvidos em processos de transporte de íons (Fig. 3.8 e Cap. 8).

Embora esse modelo esteja basicamente correto, há evidàncias crescentes de que muitas proteínas da membrana tàm mobilidade limitada e estão ancoradas no lugar por ligação às proteínas do citoesqueleto. As subestruturas da membrana, descritas como "jangadas lipídicas", demarcam também regiões das membranas com composição e função especializadas. As regiões da membrana envolvidas na endocitose e nas junções com as células adjacentes são ricas também em fosfolipídios específicos.

O papel principal das membranas é manter a integridade estrutural e a barreira funcional das células e organelas. Entretanto, as membranas não são rígidas ou impermeáveis; elas são fluidas, e seus componentes movem-se frequentemente ao redor dela, de forma orientada, sob o controle da maquinaria intracelular. A fluidez é essencial para a função da membrana e para a viabilidade celular; quando as bactérias são transferidas para uma temperatura mais baixa, elas respondem aumentando o conteúdo de ácidos graxos insaturados na membrana fosfolipídica, mantendo desse modo a fluidez da membrana na temperatura baixa. A membrana também medeia a transferància da informação e de moléculas entre o exterior e o interior da célula, incluindo o reconhecimento celular, processos de transdução de sinal e transporte de metabólitos e de íons; a fluidez é essencial para essas funções. Todas as membranas celulares, que são vistas frequentemente ao microscópio como estáticas, são estruturas bem organizadas, flexíveis e responsivas. De fato, a imagem do microscópio é como uma fotografia de uma ação de alta velocidade; pode parecer tranquila e quieta, mas há muitas ações ocorrendo.

PATCHES DA MEMBRANA

Embora o modelo do mosaico fluido esteja basicamente correto, é reconhecido que há regiões da membrana com composições de proteína e de lipídios singulares. As cavéolas, invaginações da membrana plasmática de 50-100 nm, e as jangadas lipídicas são trechos (*patches*) da membrana plasmática (microdomínios) importantes para a transdução de sinal e a endocitose. Esses trechos são ricos em colesterol e esfingolipídios, e a interação das caudas dos ácidos graxos insaturados de cadeia longa dos esfingolipídios com o colesterol resulta na estabilização do ambiente fluido. Os *patches* são insolúveis em detergente e apresentam elevada densidade flutuante na centrifugação com gradiente de densidade em sacarose. Patógenos como vírus, parasitas, bactérias e mesmo toxinas bacterianas podem penetrar na célula do hospedeiro através da ligação com componentes específicos das cavéolas. Os exemplos clássicos dos *patches* enriquecidos com uma proteína particular são a membrana púrpura de Halobacterium halobium, que contém a bacteriorodopsina, e as junções comunicantes (do tipo *gap*) contendo conexina. A bacteriorodopsina é uma bomba de prótons ativada pela luz que gera um gradiente de concentração de H^+ através da membrana bacteriana, fornecendo a energia para a captação de nutriente para o crescimento bacteriano. As junções comunicantes entre as células musculares uterinas aumentam significativamente durante os últimos estágios da gravidez. Elas fornecem canais de alta capacidade entre as células e permitem a contração coordenada do útero durante o trabalho de parto.

PERTURBAÇÃO DA MEMBRANA POR COMPOSTOS ANFIPÁTICOS

Os compostos anfipáticos tàm porções polares e apolares distintas. Eles incluem muitos anestésicos e tranquilizantes. As atividades farmacológicas desses compostos são dependentes de sua habilidade de interagir com as membranas e de perturbar a estrutura da membrana. Vários antibióticos e produtos naturais, como os sais biliares e os ácidos graxos, também são anfipáticos. Embora efetivas em concentrações terapàuticas, algumas dessas drogas exibem ação semelhante a um detergente em concentrações moderadas a elevadas e perturbam a estrutura da bicamada, resultando no rompimento da membrana.

ANCORAGEM DE PROTEÍNAS NA MEMBRANA

Os movimentos laterais de algumas proteínas da membrana são restringidos pela interação das proteínas com os conjuntos macromoleculares localizados no interior (citoesqueleto) e/ou no exterior (matriz extracelular) da célula e, em alguns casos, com as proteínas da membrana de células adjacentes, por exemplo, em junções do tipo *tight junctions* entre as células epiteliais. A difusão lateral das proteínas integrais da membrana do eritrócito, a banda 3 (um transportador de ànion) e a glicoforina, é limitada pela interação indireta com a espectrina, uma proteína do citoesqueleto, através das proteínas anquirina e banda 4.1, respectivamente. Tais interações são tão fortes que limitam a difusão lateral da proteína banda 3. Defeitos genéticos na espectrina causam a esferocitose e a eliptocitose hereditárias, doenças caracterizadas pela alteração da morfologia da célula vermelha. A mutação na anquirina afeta a localização de proteínas da membrana plasmática no músculo cardíaco, causando arritmia cardíaca, um fator de risco para a morte súbita cardíaca.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Compare o valor calórico do amido e da celulose. Explique a diferença.

2. Explique por que os dissacarídios como a lactose, a maltose e a isomaltose são açúcares redutores mas a sacarose não é.

3. O que o índice de iodo de um lipídio indica sobre sua estrutura?

4. Reveja o processo industrial para fazer sabões.

5. Reveja a história dos modelos para as membranas biológicas. Quais são as limitações do modelo original de Singer-Nicolson?

Resumo

Depois do capítulo precedente sobre aminoácidos e proteínas, este capítulo fornece fundamentos mais amplos para estudos mais avançados na bioquímica, introduzindo as características estruturais básicas e as propriedades físicas e químicas de dois principais blocos estruturais: os carboidratos e os lipídios. O conhecimento da estrutura dos carboidratos é essencial para os capítulos sobre o metabolismo intermediário e sobre a biossíntese e a função das glicoproteínas, dos glicolipídios e das proteoglicanas. Compreender a função dos lipídios na estrutura das membranas biológicas constitui um fundamento para a compreensão da função das membranas no transporte, na transdução de sinal e nos processos eletroquímicos envolvidos na produção de energia, na transmissão nervosa e na contração muscular.

Leituras sugeridas

Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update. *Curr Drug Deliv*. 2007;4:297-305.

Sengupta P, Baird B, Holowka D. Lipid rafts, fluid/fluid phase separation, and their relevance to plasma membrane structure and function. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18:583-590.

Singer SJ. Some early history of membrane molecular biology. *Annu Rev Physiol*. 2004;66:1-27.

van Deurs B, Roepstorff K, Hommelgaard AM, Sandvig K. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol*. 2003;13:92-100.

Vereb G, Szöllosi J, Matkó J, et al. Dynamic, yet structured: the cell membrane three decades after the Singer–Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8053-8058.

Zhang YM, Rock CO. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:222-233.

Sites

Estrutura de açúcares Estrutura de açúcares. http://bama.ua.edu/~lsbusenlehner/Chapter7a.pdf.

Química de açúcares Química de açúcares. www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/carbhyd.htm.

Fosfolipídios Fosfolipídios. www.cyberlipid.org/phlip/phli01.htm.

Fosfolipídios de membrana Fosfolipídios de membrana. http://cellbio.utmb.edu/cellbio/membrane_intro.htm.

História dos modelos de membrana História dos modelos de membrana. www.umn.edu/ships/9-2/membrane.htm.

Desenhos de Singer-Nicolson. http://cnx.org/content/m15255/latest/.

Sabões e saponificação Sabões e saponificação. www.kitchendoctor.com/articles/soap.html.

Sangue: Células e Proteínas Plasmáticas

W.D. Fraser

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os principais componentes do sangue.
- Explicar a diferença entre plasma e soro.
- Definir os papéis das proteínas plasmáticas e suas amplas classificações.
- Identificar as doenças associadas com a deficiência de proteínas específicas.
- Discutir a estrutura e a função das imunoglobulinas.
- Avaliar a importância patológica da gamopatia monoclonal.
- Definir a resposta de fase aguda e a alteração que esta induz nas concentrações das proteínas plasmáticas circulantes.

INTRODUÇÃO

O sangue funciona como um sistema de transporte e distribuição para o organismo, levando nutrientes essenciais para os tecidos e ao mesmo tempo retirando produtos residuais. É composto de uma solução aquosa que contém moléculas de tamanhos variados e um número vasto de elementos celulares. Alguns dos componentes do sangue exercem papéis importantes na defesa do organismo contra agentes externos e no reparo de tecidos danificados.

Com certa importância para os clínicos, o plasma também é uma “janela” no metabolismo. Devido à sua fácil obtenção, vários diagnósticos de testes de laboratório em bioquímica, hematologia e imunologia são realizados em amostras plasmáticas.

A maioria dos testes usados com mais frequência está listada no Apêndice junto com seus valores de referência.

PLASMA E SORO

O plasma é o ambiente natural das células sanguíneas, mas a maioria das dosagens químicas é feita no soro

Os elementos formadores do sangue estão suspensos em uma solução aquosa denominada plasma. O plasma é o sobrenadante obtido pela centrifugação de uma amostra sanguínea tratada com um anticoagulante para prevenir a coagulação das células vermelhas. O soro é o sobrenadante obtido quando uma amostra sanguínea entra no processo de coagulação (o que geralmente requer de 30 a 45 minutos) sendo posteriormente centrifugada. Na prática laboratorial, os anticoagulantes mais comuns são o heparinato de lítio e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O heparinato previne a coagulação ligando-se à trombina. O EDTA e o citrato ligam-se aos íons Ca^{2+} e Mg^{2+}, interferindo assim na atividade de enzimas dependentes de cálcio e magnésio (complexo conversor de protrombina, tromboplastina e trombina) que estão envolvidas na cascata de coagulação. Quando o sangue é coletado para transfusão, o citrato é utilizado como anticoagulante. Durante o processo de coagulação, o fibrinogênio é convertido em fibrina como consequência da quebra proteolítica pela trombina; sendo assim, a principal diferença entre plasma e soro é a ausência de fibrinogênio no soro.

ELEMENTOS FIGURADOS DO SANGUE

Existem três principais componentes celulares que circulam na corrente sanguínea.

Eritrócitos

Os eritrócitos não são células completas, visto que não possuem núcleo nem organelas intracelulares. São remanescentes celulares, contendo íons e proteínas específicas, os quais podem estar presentes em altas concentrações. Os eritrócitos são o produto final da eritropoiese na medula óssea, a qual está sob controle da eritropoetina produzida pelos rins (Fig. 4.1). A hemoglobina é sintetizada nas células precursoras de eritrócitos (eritroblastos e reticulócitos) sob um forte controle regido pela concentração de heme, cuja síntese envolve a quelação de íon ferroso reduzido (Fe^{2+}) por quatro átomos de nitrogênio no centro de um anel porfirínico (Cap. 29). As principais funções dos eritrócitos são o transporte de oxigênio e a remoção de dióxido de carbono; íons hidrogênio, como não possuem organelas, não são capazes de sintetizar proteínas nem efetuar reparo. Consequentemente, os eritrócitos têm uma duração de vida limitada de 60-120 dias antes de serem capturados e degradados no baço.

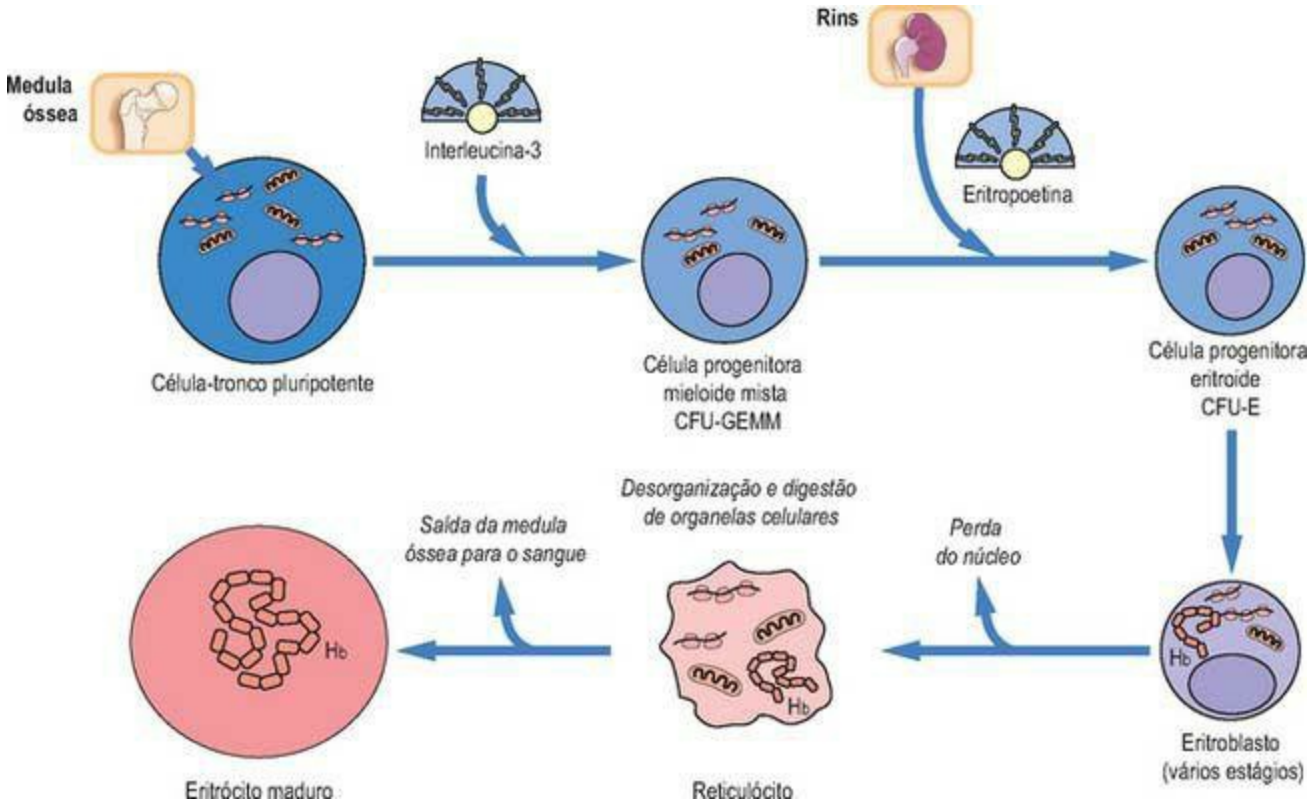


Fig. 4.1 Esquema simplificado da formação dos eritrócitos. Em média, 10^{11} eritrócitos são formados por dia. A hemoglobina é sintetizada no interior do eritrócito e do reticulócito antes da perda dos ribossomos e da mitocôndria. CFU, unidade formadora de colônias; GEMM, granulócitos, eritrócitos, monócitos, megacariócitos; CFU-E, unidade formadora de colônias de eritrócitos.

Leucócitos

Os leucócitos são células cuja função principal é proteger o organismo de infecções (Cap. 38).

A maioria dos leucócitos é produzida na medula óssea, alguns são produzidos no timo e outros se tornam maduros no interior de diversos tecidos (Fig. 4.2) (Cap. 38). Os leucócitos são capazes de controlar sua própria síntese pela secreção no sangue de peptídeos sinalizadores que, consequentemente, agem nas células-tronco da medula óssea. Para que desempenhem sua função corretamente, os leucócitos têm a capacidade de migrar para fora da corrente sanguínea penetrando em tecidos circundantes.



Fig. 4.2 Leucócitos. Classificação e funções dos leucócitos (Cap. 38).

Trombócitos (plaquetas)

Os trombócitos (plaquetas) não são células verdadeiras, e sim fragmentos envoltos por membrana derivados de megacariócitos residentes na medula óssea. Eles têm um papel-chave no processo de coagulação sanguínea (Cap. 7).

PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

As proteínas plasmáticas podem ser, de modo geral, classificadas em dois grupos: aquelas incluindo albumina, que são sintetizadas pelo fígado, e as imunoglobulinas, as quais são produzidas pelos plasmócitos da medula óssea, geralmente como parte da resposta imunológica.



PLASMA E SORO

O papel do laboratório de análises clínicas

O laboratório de análises clínicas realiza grande número de exames bioquímicos com os fluidos corporais, os quais podem fornecer respostas para questões clínicas específicas sobre um determinado paciente. Tais análises são comumente solicitadas para ajudar no diagnóstico ou tratamento de condições específicas. A maior parte das amostras recebidas pelo laboratório consiste em sangue e urina. Apesar de algumas avaliações serem realizadas no sangue total, a maioria das análises de moléculas e íons é feita no soro ou no plasma. Em geral, o tempo dedicado para a análise de cada amostra é relativamente curto, mas o processo completo, que vai desde a solicitação de uma análise até o recebimento de um resultado, envolve várias etapas e pode levar horas. Durante todo o processo, é feita uma checagem constante, e o controle de qualidade é realizado para assegurar que os resultados produzidos são analítica e clinicamente válidos. Um esquema do ambiente de trabalho de um laboratório de análises clínicas é mostrado na Figura 4.3.

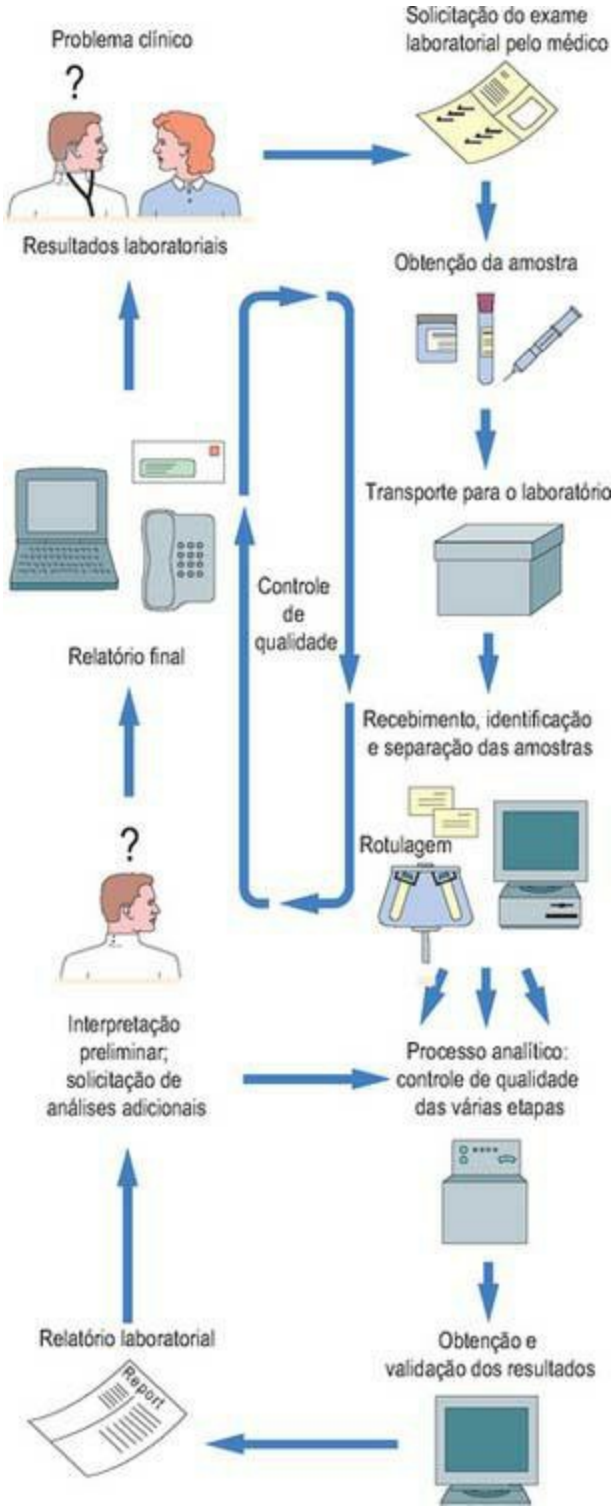


Fig. 4.3 A função de um laboratório de análises clínicas. Diagrama de fluxo indicando os passos envolvidos na obtenção de resultados a partir do laboratório de análises clínicas.

Grande número de proteínas plasmáticas tem a capacidade de se ligar a certos ligantes com alta afinidade e especificidade. Essas proteínas podem atuar como um reservatório para o ligante e auxiliar a controlar sua distribuição e disponibilidade ao transportá-las para os tecidos ao longo do corpo. A ligação de uma proteína também pode tornar uma substância tóxica menos nociva para os tecidos. As principais proteínas de ligação e seus ligantes são mostrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Proteínas transportadoras e seus ligantes. Quase todas as prote-ínas plasmáticas se ligam a ligantes, e esta é a principal

função de várias proteínas. A albumina tern a capacidade de se ligar fracamente a várias moléculas e de forma inespedfica, mas outras proteinas podem se ligar fortemente a moléculas específicas — por exemplo, a transferrina é específica para ion férrico (Fe^{3+})

Proteinas transportadoras e seus ligantes	
Proteinas	**Ligantes**
Ligadoras de cation	
Albumina	Cations divalentes e trivalentes (p. ex., Cu^{2+}, Fe^{3+})
Ceruloplasmina	Cu^{2+}
Transferrina	Fe^{3+}
Ligadoras de hormônios	
Globulina ligadora de tiroxina (TBG)	Tiroxina (T_4, tri-iodotironina (T_3)
Globulina ligadora de cortisol	

(CBG)	Cortisol
Globulina ligadora de hormônio sexual	Andrógenos (testosteronas), estrógenos
(SHBG)	(estradiol)
Hemoglobina/ligadora de protoporfirina	
Albumina	Heme, bilirrubina, biliverdina
Haptoglobina	Dimerosde hemoglobina
Ligadoras de aciclos graxos	
Albumina	Áciclos graxos não esterificados, esteroides



SÍNDROME NEFRÓTICA

Uma mulher de 44 anos de idade foi admitida em um hospital com queixa de fraqueza, anorexia, infecções recorrentes, edema bilateral dos membros inferiores e falta de ar. Sua concentração de albumina plasmática era de 19 g/L (faixa normal 36-52 g/L) e sua excreção de proteína na urina era de 10 g/24 h (valores normais < 0,15 g/24 h). Apresentava hematúria (presença de sangue na urina) microscópica. A biópsia renal confirmou o diagnóstico como glomerulonefrite membranoproliferativa.

Comentário. Essa paciente teve a clássica tríade da síndrome nefrótica: hipoalbuminemia, proteinúria e edema. A nefrite causou um dano à membrana basal glomerular, resultando em perda de albumina. A perda contínua de albumina excede a capacidade sintética do fígado que resulta em hipoalbuminemia; consequentemente, a pressão osmótica capilar está significativamente reduzida. Isso leva tanto a edema periférico (perna) quanto a edema pulmonar (falta de ar). Com o aumento do dano glomerular, as proteínas de alto peso molecular, como as imunoglobulinas e o complemento (Cap. 38), são perdidas.

Albumina

A albumina, além de exercer a função de reserva proteica quando há depleção nutricional e como regulador osmótico, é a principal proteína de transporte

A albumina, proteína plasmática predominante que não apresenta atividade enzimática ou hormonal conhecida, representa aproximadamente 50% das proteínas encontradas no plasma humano e está presente normalmente em concentrações que variam de 35-45 g/L. É facilmente isolada e tem sido extensivamente estudada. Com peso molecular que gira em torno de 66 kDa, a albumina é uma das menores proteínas plasmáticas e, dada sua natureza altamente polar, dissolve-se facilmente em água. Em pH 7,4, apresenta-se como um ânion com 20 cargas negativas por molécula e isso lhe dá vasta capacidade para ligações não seletivas para muitos ligantes. A presença de altas quantidades de albumina no corpo (4-5 g/kg de peso corporal), com pelo menos 38% presente na região intravascular, também ajuda a explicar o papel crucial que a albumina exerce na pressão osmótica coloidal.

A taxa de síntese de albumina (14-15 g por dia) é dependente do estado nutricional do indivíduo, especialmente no nível de deficiências de aminoácidos. A meia-vida da albumina gira em torno de 20 dias, e a degradação parece ocorrer por pinocitose em todos os tecidos. Mais importante ainda, embora os níveis de albumina reflitam o estado nutricional a longo prazo, em pacientes hospitalizados as alterações a curto prazo na concentração de albumina plasmática ocorrem geralmente devido a desidratação (Cap. 23).

A albumina é a principal proteína plasmática responsável pelo transporte de ácidos graxos hidrofóbicos, bilirrubina e drogas

A albumina exerce uma capacidade singular de solubilizar, em fase aquosa, uma gama de substâncias que incluem os ácidos graxos de cadeia longa, esteróis e vários compostos sintéticos. O transporte dos ácidos graxos de cadeia longa serve de base para distribuir pelo organismo vários substratos ricos em energia. É através dessa ligação, com consequente solubilização e posteriormente transporte de ácidos graxos, como o ácido esteárico, o ácido oleico e o ácido palmítico, que a albumina possibilita o transporte dessas moléculas hidrofóbicas em um meio predominantemente hidrofílico que é o plasma. Estudos associativos demonstraram a presença de numerosos sítios de ligação para ácidos graxos na molécula de albumina com afinidades variadas. Acredita-se que os sítios de maior afinidade estejam situados em segmentos globulares dentro de fendas especializadas da molécula de albumina (Fig. 4.4).

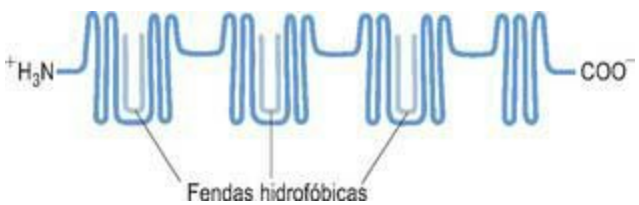


Fig. 4.4 Modelo molecular da albumina humana. As fendas hidrofóbicas são segmentos globulares da albumina que ligam ácidos graxos com alta afinidade.

Além da ligação a ácidos graxos, a albumina tem um papel importante na ligação de bilirrubina

não conjugada, tornando-a desse modo não só solúvel em água e transportável do sistema retículo endotelial para o fígado, mas também deixando-a temporariamente não tóxica. Na presença de concentrações excessivamente elevadas de bilirrubina não conjugada, a capacidade de ligação da albumina está excedida, e em crianças essa condição pode contribuir para o desenvolvimento de quernictero (*kernicterus*) (Cap. 29).

A presença de sítios na molécula de albumina que são capazes de ligar uma variedade de drogas, incluindo salicilatos, barbitúricos, sulfonamidas, penicilina e varfarina, é de grande relevância farmacológica. Sobretudo tais interações são fracas e os ligantes se tornam facilmente deslocados do sítio de ligação por competidores. Por realizar tais ligações, a albumina não somente participa da solubilização de drogas, mas também pode determinar uma proporção da droga livre e, dessa forma, farmacologicamente ativa no plasma.

Surpreendentemente, de certa forma a albumina não é essencial para a sobrevivência humana, e raros defeitos congênitos já foram descritos onde existe hipoalbuminemia ou completa ausência de albumina (analbuminemia).

Proteínas transportadoras de íons metálicos

A capacidade de proteínas se ligarem a íons metálicos é de grande importância

O ferro é um elemento essencial para vários processos metabólicos e é um componente importante das heme proteínas, da mioglobina, da hemoglobina e dos citocromos. No plasma, o ferro é transportado ligado à transferrina sob a forma de íons férricos (Fe^{3+}) e é liberado da proteína para os tecidos depois de se ligar aos receptores celulares específicos e da internalização do complexo resultante. O ferro é posteriormente depositado em sítios de armazenamento como a ferritina ou hemossiderina ou é utilizado na síntese de proteínas heme. A ligação dos íons férrico na transferrina protege contra os efeitos tóxicos desses íons. Em reações inflamatórias, o complexo ferro-transferrina é degradado pelo sistema reticuloendotelial sem um aumento correspondente na síntese de seus componentes: isso resulta em baixas concentrações plasmáticas de transferrina e ferro.

- A ferritina é a principal proteína de armazenamento de ferro encontrada em quase todas as células do organismo. Ela age como reservatótio de ferro no fígado e na medula óssea. A concentração de ferritina no plasma é proporcional à quantidade de ferro armazenado; por conseguinte, a dosagem de ferritina plasmática é um dos melhores indicadores de deficiência de ferro.

- A hemossiderina é um derivado da ferritina e é encontrada no fígado, baço e medula óssea. É insolúvel em soluções aquosas e forma agregados que liberam lentamente o ferro quando ocorre deficiência desse metal.

- A ceruloplasmina é a principal proteína transportadora de cobre, um elemento-traço essencial. A ceruloplasmina auxilia a exportação de cobre do fígado para os tecidos periféricos e é fundamental para a regulação das reações de oxidação e redução, transporte e utilização de ferro (Fig. 4.5). Concentrações elevadas de ceruloplasmina ocorrem em doenças hepáticas e em lesões teciduais.

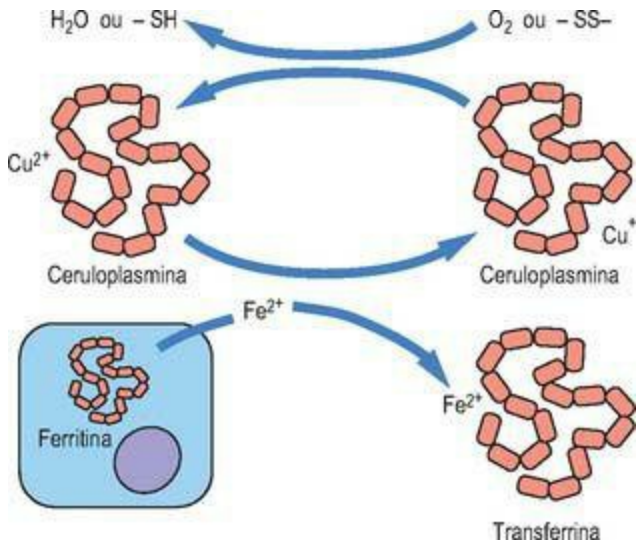


Fig. 4.5 Atividade ferroxidase da ceruloplasmina plasmática. A oxidação de Fe^{2+} pela ceruloplasmina permite a ligação e transporte do ferro pela transferrina plasmática. O íon cuproso (Cu^{2+}) ligado a ceruloplasmina é regenerado pela reação com oxigênio e com grupamentos tiol oxidados.

HEMÓLISE E HEMOGLOBINA LIVRE

Manuseio da hemoglobina livre

Quando os eritrócitos são prematuramente hemolisados, eles liberam hemoglobina para o plasma, onde ela se dissocia a dímeros que se ligam à haptoglobina. O complexo hemoglobina-haptoglobina é metabolizado mais rapidamente do que a haptoglobina sozinha, nas células hepáticas e no sistema reticuloendotelial, produzindo um complexo ferro-globulina e bilirrubina. Isso evita a perda de ferro na urina. Quando ocorre hemólise excessiva, a concentração de haptoglobina plasmática pode ficar muito baixa. Se a hemoglobina se dissocia em heme e globina, o heme livre se liga à hemopexina; ao contrário da haptoglobina, que é uma proteína de fase aguda, a hemopexina não é afetada pela resposta de fase aguda. O complexo heme-hemopexina é capturado pelas células hepáticas, onde o ferro se liga à ferritina. Um terceiro complexo chamado metemalbumina pode ser formado entre o heme oxidado e a albumina. Esses mecanismos evoluíram para permitir que o organismo não somente elimine ferro prevenindo maiores perdas, mas também complexe o heme livre, o qual é tóxico para vários tecidos.

Baixas concentrações de ceruloplasmina e cobre total são observadas na doença de Wilson, uma desordem autossômica recessiva de transporte de cobre. Esse defeito genético que ocorre no cromossomo 13 resulta em mutação na adenosina trisfosfatase do tipo P transportadora de cobre (ATP7B), a qual é responsável pelo transporte de cobre até a ceruloplasmina e eliminação de cobre através da bile. A mutação em ATP7B resulta em acúmulo de cobre no fígado, no cérebro e nos rins. Essas mutações são prontamente identificadas pelo haplótipo e análise mutacional, sendo possível, assim, uma varredura genética de pacientes e de seus familiares para a doença de Wilson (Cap. 11).

DOENÇA DE WILSON

Uma menina de 14 anos de idade foi admitida no setor da emergência de um hospital. Ela estava ictérica, com dor abdominal e tinha o fígado sensível e aumentado, com sonolência e asterixis (tremores oscilantes) devido à insuficiência hepática aguda. A história pregressa revelou distúrbios de comportamento, dificuldade de realização de movimentos em passado recente e ausência às aulas do colégio. Sua concentração de ceruloplasmina era de 50 mmol/L (faixa normal 200–450 mmol/L (20–45 mg/dL)), a do cobre sérico era de 8 mmol/L (faixa normal 10–22 μmol/L (65–144 μg/dL)), a excreção urinária de cobre era de 2,2 mmol/24 h (faixa normal 2–3,9 μmol/24 h (13–25 μg/dL)) e a biópsia do fígado estabeleceu o dignóstico de doença de Wilson.

Comentário.Esse caso destaca a importância da dosagem de ceruloplasmina. Na doença de Wilson, uma deficiência de ceruloplasmina acarreta baixas concentrações de cobre no plasma. Essa falha metabólica está na excreção de cobre na bile e na sua reabsorção pelos rins; o cobre é depositado no fígado, no cérebro e nos rins. Os sintomas hepáticos estão presentes em pacientes mais jovens, e a cirrose e os problemas neuropsiquiátricos se manifestam naqueles que são mais velhos. A detecção de baixas concentrações de ceruloplasmina e cobre no plasma, a excreção urinária do cobre

aumentada e aumentos acentuados de cobre no fígado confirmam o diagnóstico.

Imunoglobulinas

Imunoglobulinas são proteínas produzidas em resposta a substâncias estranhas (antígenos; Cap. 38)

O sistema imune deve ser considerado como duas entidades independentes, compostas por células linfoides diferentes: os linfócitos T derivados do timo, que exercem imunorregulação e função imune celular, e os linfócitos B, que sintetizam e secretam anticorpos (imunoglobulinas). Esses anticorpos são proteínas produzidas pelo sistema imune e apresentam especificidade definida para uma partícula estranha (imunógeno) que estimulou sua síntese. Entretanto, nem todas as substâncias estranhas que penetram no organismo podem produzir essa resposta,; aquelas que têm essa capacidade são chamadas de imunógenos, enquanto qualquer agente que pode se ligar a um anticorpo é denominado antígeno.

As imunoglobulinas são um grupo de moléculas singularmente diverso, reconhecendo e reagindo especificamente com uma vasta gama de estruturas antigênicas (epítopos) resultando no aumento de uma série de efeitos que levam à eventual eliminação do antígeno apresentado. Algumas imunoglobulinas têm funções efetoras adicionais: por exemplo, a IgG está envolvida na ativação do complemento.

Estrutura das imunoglobulinas

Imunoglobulinas compartilham uma estrutura em forma de Y comum composta de duas cadeias pesadas e duas cadeias leves

A imunoglobulina é uma molécula em forma de Y que contém duas unidades idênticas denominadas cadeias pesadas (H) e outras duas unidades idênticas, porém menores, denominadas cadeias leves (L). Existem várias cadeias H, e a natureza dessas cadeias determina a classe de imunoglobulina: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE são caracterizadas por cadeias pesadas γ, α, μ, Δ e ε, respectivamente. As cadeias L são apenas de dois tipos, κ e λ, e ambos os tipos podem ser encontrados em qualquer uma das classes de imunoglobulinas, embora obviamente não pertençam à mesma molécula. Cada cadeia polipeptídica de uma imunoglobulina é caracterizada por uma série de regiões globulares, as quais possuem uma considerável homologia em sua sequência e, em termos evolutivos, são provavelmente derivadas da duplicação de um protogene.

Os domínios N-terminais de ambas as cadeias H e L contêm uma região cuja sequência de aminoácidos é variável (a região V); juntas, essas regiões determinam a especificidade antigênica. As cadeias H e L são necessárias para a atividade completa do anticorpo, já que as regiões V fisicamente justapostas às cadeias L e H formam um complexo funcional no qual o epítopo se encaixa; essa porção da molécula é denominada região de reconhecimento do anticorpo (Fab_2). O domínio imediatamente adjacente à região V, tanto da cadeia H quanto da L, possui variabilidade muito menor. O restante da cadeia H consiste em uma região constante (região Fc) formada pela região de dobradiças e dois domínios adicionais. Essa região constante é responsável por outras funções da imunoglobulina além do reconhecimento do epítopo, como a ativação do complemento (Cap. 38). Essa estrutura básica das imunoglobulinas está representada na Figura 4.6. Quando um antígeno se liga a uma imunoglobulina, alterações conformacionais são transmitidas ao longo da

região da dobradiça do anticorpo até a região Fc, a qual se torna ativada.

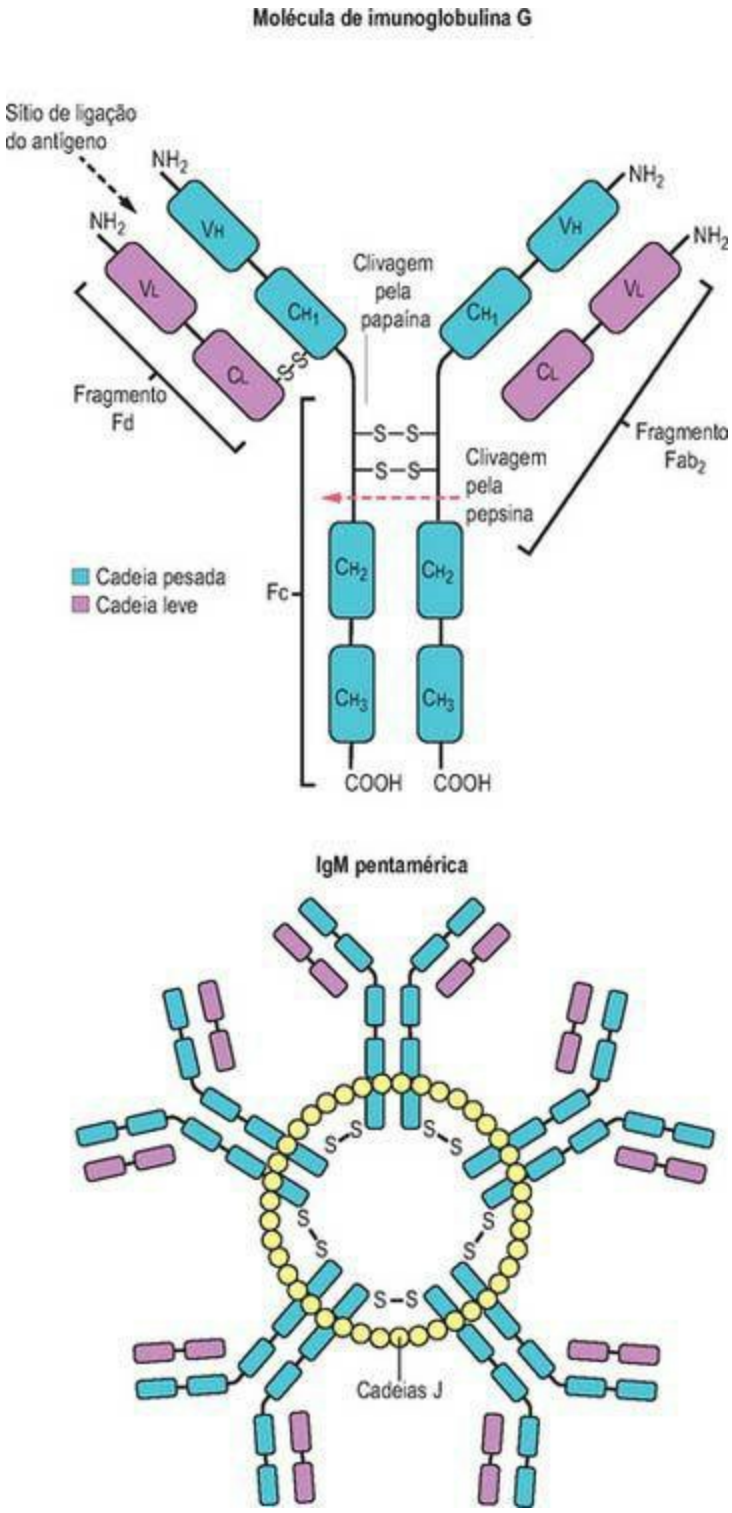


Fig. 4.6 A estrutura das imunoglobulinas. Diagrama representando a estrutura básica de uma imunoglobulina monomérica e de uma imunoglobulina pentamérica (IgM). V, região viariável; C, região constante; H, cadeia pesada; L, cadeia leve; cadeia J, cadeia de junção; Fab_2, fragmento gerado pela clivagem da molécula pela pepsina; Fc, Fd, fragmentos gerados pela ação proteolítica da papaína.

Principais imunoglobulinas

A IgG é a imunoglobulina mais comum que protege os espaços teciduais e atravessa a placenta

livremente

A IgG, com uma massa molecular total de 160 kDa, consiste na subunidade básica 2H2L da imunoglobulina unida por um número variávelde pontes dissulfeto. As cadeias γH têm várias diferenças antigênicas e estruturais, permitindo a classificação da IgG em numerosas subclasses de acordo com o tipo de cadeia H presente; entretanto, as diferenças funcionais entre as subclasses não são relevantes.

A IgG circula em altas concentrações no plasma, representando cerca de 75% das imunoglobulinas presentes em adultos e com uma meia-vida de 22 dias. Está presente em todos os fluidos extracelulares e parece eliminar pequenas proteínas antigênicas solúveis através da agregação e aumento da fagocitose pelo sistema reticuloendotelial. A partir de 18-20 semanas de gestação, a IgG é ativamente transportada através da placenta, fornecendo imunidade humoral para o feto e o neonato antes da maturação do seu sistema imune.

A IgA é amplamente encontrada em secreções e atua como uma barreira antisséptica, a qual protege as superfícies das mucosas

A IgA tem uma cadeia H similar à cadeia γ da IgG e suas cadeias α possuem 18 aminoácidos extras na região *C* terminal. Essa sequência peptídica extra permite a ligação de uma "junção' ou cadeia J. Esse pequeno glicopeptídeo ácido (129 resíduos), sintetizado pelos plasmócitos, permite a dimerização da IgA secretória. A IgA também é frequentemente encontrada em associação não covalente com o chamado componente secretório, um polipetídeo altamente glicosilado com 71 kDa, sintetizado pelas células da mucosa e capazes de proteger a IgA contra digestão proteolítica.

A IgA representa 7–15% das imunoglobulinas do plasma e tem meia-vida de seis dias. É particularmente encontrada na forma dimerizada nas secreções das parótidas, dos brônquios e dos intestinos. É o principal componente do colostro (o primeiro leite materno após o nascimento da criança). Parece que a IgA funciona como barreira imunológica primária contra a invasão das membranas mucosas por patógenos. Pode promover fagocitose, causar degranulação de eosinófilos e ativar o complemento através da chamada via alternativa.

A IgM está confinada ao espaço intravascular e auxilia na eliminação de antígenos circulantes e micro-organismos

As imunoglobulinas pertencentes a essa última classe principal são polivalentes, com elevada massa molecular. A IgM tem uma forma básica similar à da IgA, possuindo um domínio extra na cadeia H que permite a ligação de uma cadeia J, também sendo capaz de polimerização. A IgM normalmente circula na forma de um pentâmero, o qual apresenta massa molecular de 971 kDa, ligado por pontes dissulfeto e pela cadeia J (Fig. 4.6).

A IgM representa 5–10% das imunoglobulinas plasmáticas e tem meia-vida de cinco dias. Em virtude da sua natureza polimérica e da alta massa molecular, a maioria das IgM é encontrada confinada ao espaço intravascular, embora possa ser encontrada nas secreções em menor quantidade, normalmente em associação com componentes secretórios. É o primeiro anticorpo a ser sintetizado após um desafio antigênico.

MIELOMA MÚLTIPLO

Um homem de 65 anos de idade apresentou repentino princípio de dor nas costas. A radiografia revelou fratura por compressão de segunda vértebra lombar descontínuo e lesões cranianas focais,

chamadas de lesões em saca-bocado. A eletroforese do soro mostrou a presença de imunoglobulina monoclonal. Isso provou ser uma imunoglobulina do tipo IgG e, na eletroforese, um excesso de cadeias κ livres (proteína de Bence-Jones) também foi encontrado na urina do paciente.

Comentário. O mieloma múltiplo afeta homens e mulheres com igual incidência e surge na maior parte das vezes após os 50 anos de idade. As características clínicas são resultantes da proliferação maligna de plasmócitos monoclonais e da síntese e secreção de anticorpos por essas células. As lesões nos ossos afetam crânio, vértebras, costelas e pelve. Pode haver osteoporose generalizada e fraturas patológicas. Em cerca de 20% dos casos, não é detectada nenhuma proteína plasmática, embora as proteínas Bence-Jones estejam presentes na urina. Tais casos são comumente associados com a supressão da produção de outras imunoglobulinas (imunoparesia). A presença do excesso de cadeias leves pode causar falência renal como consequência da deposição de proteínas Bence-Jones nos túbulos renais ou amiloidose. Outras descobertas comuns em mielomatose incluem anemia e hipercalcemia.

Outras imunoglobulinas

A IgD é o receptor de superfície para antígenos nos linfócitos B

A IgD difere da estrutura padrão das imunoglobulinas principalmente pelo seu alto conteúdo de carboidratos com inúmeras unidades de oligossacarídios, resultando em um aumento da massa molecular com 190 kDa. As cadeias Δ são caracterizadas por apresentar somente uma única ponte dissulfeto interconectando-as e uma região de dobradiça alongada que é particularmente suscetível à proteólise.

Representando cerca de 0,5% da quantidade das imunoglobulinas plasmáticas circulantes, a IgD tem um papel indefinido, embora como um componente da superfície de células B madura provavelmente desempenhe o mesmo papel na resposta aos antígenos. Os raros casos de deficiência isolada de IgD parecem estar associados com alguma patologia não óbvia.

A IgE está presente somente em quantidades pequenas e atua ligando-se ao antígeno promovendo a liberação de aminas vasoativas dos mastócitos

Similarmente à IgM em sua unidade estrutural, a IgE tem cadeias pesadas ε que consistem em cinco domínios, em vez de quatro, porém não ocorre ligação com a cadeia J nem formação de polímeros. A cadeia H estendida ajuda a explicar a alta massa molecular da IgE, a qual é de aproximadamente 200 kDa.

A IgE tem elevada afinidade por sítios de ligação em mastócitos e basófilos. A ligação antigênica na região Fab_2 induz a formação de uma ligação cruzada do receptor de alta afinidade, exercendo granulação da célula e liberação de aminas vasoativas. Através desse mecanismo, a IgE desempenha um papel importante na alergia/atopia e medeia a imunidade antiparasitária.

Imunoglobulinas monoclonais

Imunoglobulinas monoclonais são o produto de uma única célula B e surgem a partir de transformações malignas ou benignas de células B

As imunoglobulinas monoclonais resultam da proliferação de um único clone de célula B, o qual, dessa forma, produz anticorpos idênticos. Normalmente, são moléculas estruturalmente normais, mas às vezes elas podem estar de alguma maneira fragmentadas ou truncadas. A identidade física absoluta das imunoglobulinas monoclonais leva a uma única banda em uma eletroforese em gel, revelada pela coloração da proteína com uma banda única e densa na região γ (a banda da paraproteína) (Fig. 4.7).

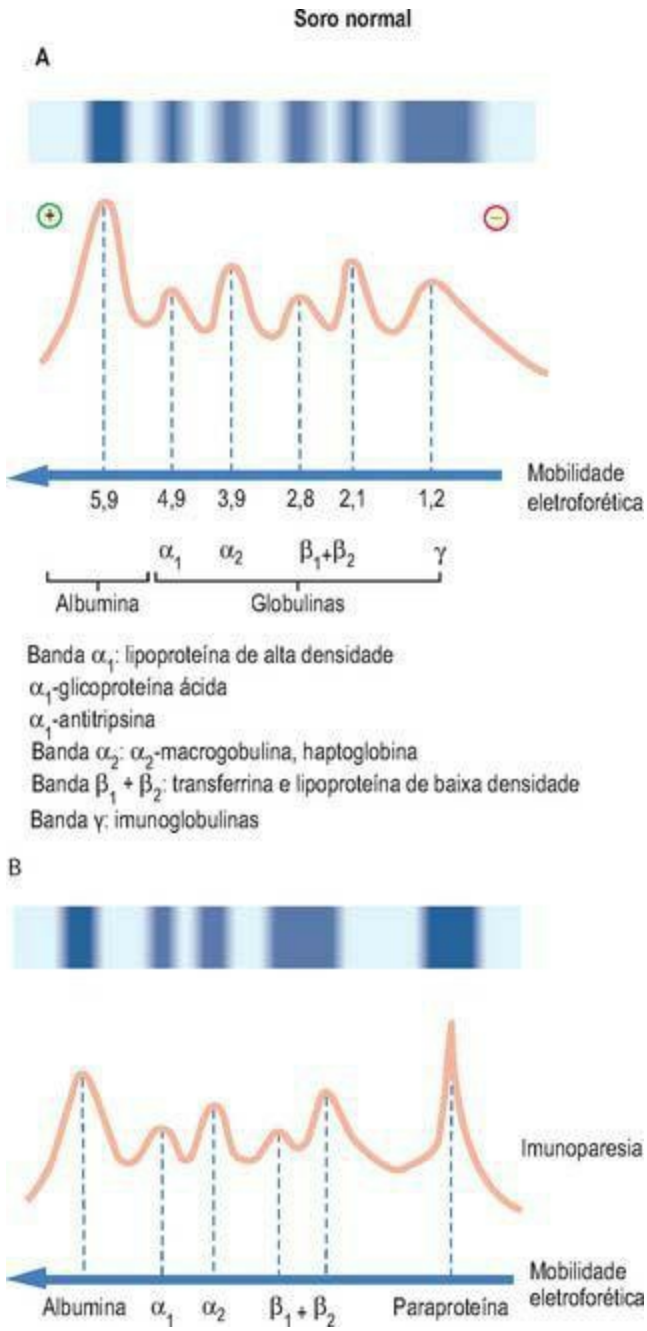


Fig. 4.7 Comparação da aparência eletroforética de um soro normal com a de um soro contendo imunoglobulinas monoclonais. Os picos do padrão de varredura (linha sólida) representam as concentrações relativas das proteínas separadas. (A) Soro normal. (B) Gamopatia monoclonal: uma banda intensamente corada está presente na região da γ-globulina na eletroforese e há uma redução associada na coloração do restante da região γ (imunoparesia).

As imunoglobulinas monoclonais estão associadas com diversas patologias malignas, como o mieloma e a macroglobulinemia de Waldenström, e também com transformações mais benignas que são geralmente denominadas gamopatias monoclonais de significado indeterminado (MGUS).

A RESPOSTA DE FASE AGUDA E PROTEÍNA C REATIVA

A resposta de fase aguda é uma resposta não específica à lesão tecidual ou infecção; afeta diversos órgãos e tecidos

Durante a resposta de fase aguda, há um aumento característico marcante da síntese de algumas proteínas (predominantemente no fígado), junto com o decréscimo da concentração de outras no plasma (Fig. 4.8). Um aumento na síntese de proteínas, como os inibidores de proteases (α_1-antitripsina), as proteínas de coagulação (fibrinogênio, protrombina), as proteínas do complemento e a proteína C reativa, é de um benefício clínico evidente. A síntese de albumina, transtiretina (pré-albumina) e transferrina decresce durante a resposta de fase aguda, sendo assim chamadas de "reagentes negativos da fase aguda'.

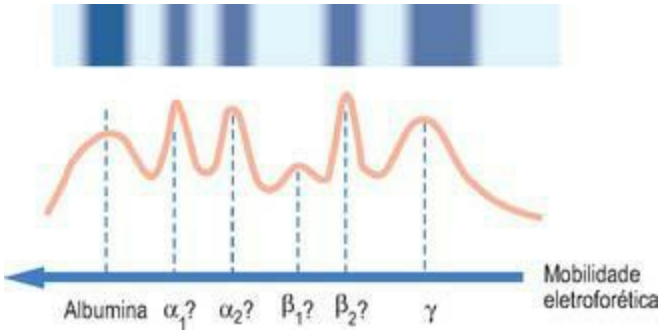


Fig. 4.8 Resposta de fase aguda. Padrão eletroforético de gel observado no soro durante uma resposta de fase aguda. A albumina está diminuída, a soma das globulinas α_1 e α_2 está aumentada, as β_1-globulinas estão diminuídas, as β_2-globulinas estão aumentadas e há um pequeno aumento das γ-globulinas.

A proteína C reativa (PCR) é o principal componente da resposta de fase aguda e um marcador de infecção bacteriana. É sintetizada no fígado e composta de cinco subunidades polipeptídicas, tendo peso molecular de cerca de 130 kDa. Está presente em pequenas quantidades (< 1 mg/L no soro normal) e acredita-se que medeia a ligação de polissacarídeos estranhos, fosfolipídios e poliânions complexos, também ativando o complemento através da via clássica (Cap. 38). A dosagem da concentração da PCR no plasma é um teste essencial no diagnóstico e monitoramento de infecções e sepse.

Além disso, utilizando o ensaio para a PCR, o qual é aproximadamente 100 vezes mais sensível do que o método de dosagem de PCR convencional, o primeiro pode detectar mínimas flutuações na concentração dessa proteína. Pequenos aumentos na concentração da PCR parecem refletir o estado de inflamação crônica de baixo grau, o qual está associado, por exemplo, com o aumento do risco de doença cardiovascular (Cap. 18). Outras condições inflamatórias como as doenças inflamatórias do intestino, o diabetes tipo dois e a síndrome metabólica (Cap. 21), e também o aneurisma aórtico abdominal e a ruptura prematura da bolsa durante a gravidez, têm sido associadas com esses pequenos aumentos na concentração de PCR no soro.

RESPOSTA DE FASE AGUDA

Uma mulher de 45 anos de idade sofreu lesão severa nos membros inferiores em acidente de trânsito. Depois de sua admissão no hospital, o perfil bioquímico revelou pequeno decréscimo da concentração total de proteína sérica (58 g/L; normal 60–80 g/L) e albumina sérica (38 g/L; normal 36–52 g/L). A eletroforese do soro revelou aumento nas frações proteicas α_1 e α_2. Quatro dias após a cirurgia, a condição da paciente se deteriorou e ela desenvolveu aumento de temperatura, sudorese e confusão. Foi diagnosticada uma infecção aguda e o tratamento com antibióticos apropriados foi iniciado. As concentrações de PCR atingiram um pico em cinco dias após a cirurgia (Fig. 4.9).

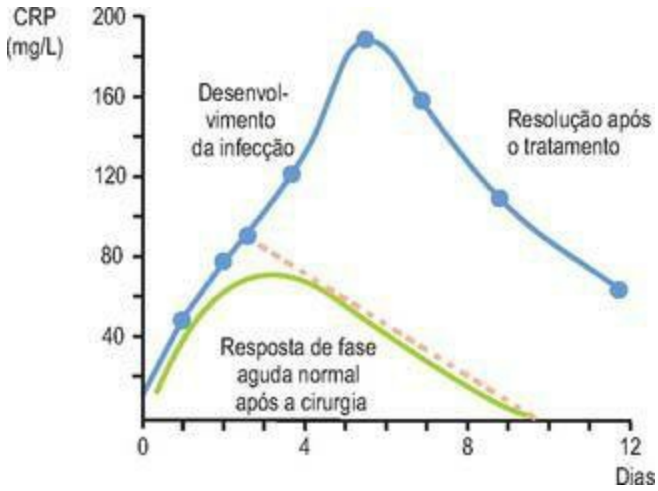


Fig. 4.9 Proteína C reativa (PCR) e a reação de fase aguda pós-cirúrgica. A concentração da PCR aumenta como parte da resposta de fase aguda ao trauma cirúrgico, e o posterior aumento deve ser observado quando a recuperação é complicada por uma infecção. (A linha tracejada representa resposta à cirurgia sem complicação.)

Comentário. O aumento das concentrações de proteínas α_1 e α_2 (as quais incluem α_1-antitripsina, α_1-glicoproteína acida e haptoglobina), associado com o decréscimo da concentração de albumina sérica, sugere uma resposta de fase aguda. Essa resposta está também associada com aumento na PCR, na velocidade de hemossedimentação (VHS) e na viscosidade do plasma. A resposta terapêutica ao tratamento da infecção pode ser estimada por um decréscimo na concentração de PCR no plasma.

Resumo

■Os elementos figurados do sangue são os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas. Eles estão suspensos em uma solução aquosa (plasma) e possuem várias funções especializadas, como o transporte de oxigênio, a destruição de agentes externos e a coagulação do sangue. Quando o sangue entra no processo de coagu-lação, obtemos o soro. Os testes bioquímicos, em sua maioria, são feitos no soro. Para obter o plasma, o sangue deve ser colocado em um tubo contendo anticoagulante.

■O plasma contém muitas proteínas classificadas, de modo geral, em albumina e globulinas (predominantemente imunoglobulinas). A albumina funciona como o principal transportador proteico para vários ligantes — metais-traço (em baixa quantidade), hormônios, bilirrubina e ácidos graxos livres.

■Outras proteínas são mais especializadas: elas se unem a ligantes específicos, por exemplo, a ceruloplasmina se liga ao Cu^{2+} e a globulina ligadora de tiroxina (TBG) se liga aos hormônios da tireoide.

■As imunoglobulinas são moléculas singulares que participam da defesa do organismo contra antígenos que podem penetrar ou tentar penetrar no corpo. Elas têm estruturas em comum e existem cinco classes de imunoglobulinas com diferentes funções protetoras.

■Alterações nas concentrações das proteínas plasmáticas fornecem informações clínicas importantes. O padrão característico constituído por decréscimo de albumina, transtiretina e transferrina e aumento de α_1-antitripsina, fibrinogênio e proteína C reativa indica uma resposta de fase aguda.

■A eletroforese das proteínas do soro e da urina é um importante método para identificar a presença de imunoglobulinas monoclonais.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Compare e contraste o plasma e o soro e discuta a diferença entre tipos de amostras sanguíneas retiradas para testes laboratoriais.

2. Discuta o papel do transporte da albumina sérica.

3. Descreva a estrutura básica das imunoglobulinas e os diferentes papéis exercidos na imunidade por suas diferentes classes.

4. Como a reação de fase aguda afeta o resultado de testes sanguíneos?

5. Caracterize a doença de Wilson.

6. O que acontece com a hemoglobina quando os eritrócitos se rompem?

Leituras sugeridas

Anderson KC, Shaughnessy JD, Barlogie B, Harousseau JL, Roodman GD. Multiple myeloma. *Hematology*. American Society of

Hematology Education Program Book 2002;214-240. (Texto na íntegra disponível em www.asheducationbook.org)

El-Youssef M. Wilson's disease. *Mayo Clin Proc*. 2003;78:1126-1136.

Hayashi T, Hideshima T, Anderson KC. Novel therapies for multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2003;120:10-17.

SM Lewis, B. Bain, I. Bates, editors. Practical haematology, 9th edn, London: Churchill Livingstone, 2001.

Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*. 2003;111:1805-1812. (Texto na íntegra disponível em *www.jci.org*)

Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis. *Hypertension*. 2004;44:6-11.

Zimmermann MA, Selzman CH, Cothren C. Diagnostic implications of C-reactive protein. *Arch Surg*. 2003;138:220-224.

Transporte de Oxigênio

G.M. Helmkamp

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever o mecanismo de ligação do oxigênio à mioglobina e à hemoglobina.
- Descrever as diferenças conformacionais entre as hemoglobinas oxigenadas e desoxigenadas.
- Definir o conceito de cooperatividade na ligação do oxigênio à hemoglobina.
- Descrever o efeito Bohr e seu papel na modulação da ligação do oxigênio à hemoglobina.
- Explicar como o 2,3-bifosfoglicerato interage com a hemoglobina e influencia a ligação do oxigênio.
- Resumir o processo pelo qual o dióxido de carbono é transportado dos tecidos periféricos aos pulmões.
- Descrever as classificações principais das hemoglobinopatias.
- Descrever as bases moleculares da anemia falciforme.

INTRODUÇÃO

Com a evolução dos organismos metazoários, ~0,5 × 10^9 anos atrás, a vida se tornou dependente da obtenção de energia a partir de ligações químicas à base de oxigênio (O_2). Os vertebrados são organismos aeróbicos com um sistema circulatório fechado e um mecanismo para extração de O_2 do ar (ou da água) e liberação de dióxido de carbono (CO_2) como produto residual. O oxigênio inspirado leva a uma utilização eficiente dos combustíveis metabólicos, tais como a glicose e ácidos graxos; o CO_2 expirado é o produto principal do metabolismo celular. Essa utilização do O_2 como um substrato metabólico é acompanhada pela geração de espécies de radicais livres que são capazes de danificar virtualmente todas as macromoléculas biológicas. Os organismos se protegem do dano pelos radicais livres de várias formas: sequestrando O_2, limitando sua produção e se desintoxicando. As hemeproteínas, de forma interessante, participam desses mecanismos protetores. As principais hemeproteínas em mamíferos são a mioglobina (Mb) e a hemoglobina (Hb). A Mb é encontrada primariamente nos músculos estriado e esquelético, e serve para armazenar O_2 no citoplasma e liberá-lo sob demanda para a mitocôndria. A Hb está restrita aos eritrócitos, onde facilita o transporte de O_2 e CO_2 entre os pulmões e os tecidos periféricos. Este capítulo apresenta as características moleculares da Mb e da Hb, as relações bioquímicas e fisiológicas entre as estruturas da Mb e da Hb, suas interações com o O_2 e outras pequenas moléculas, e os aspectos patológicos de mutações selecionadas da Hb.

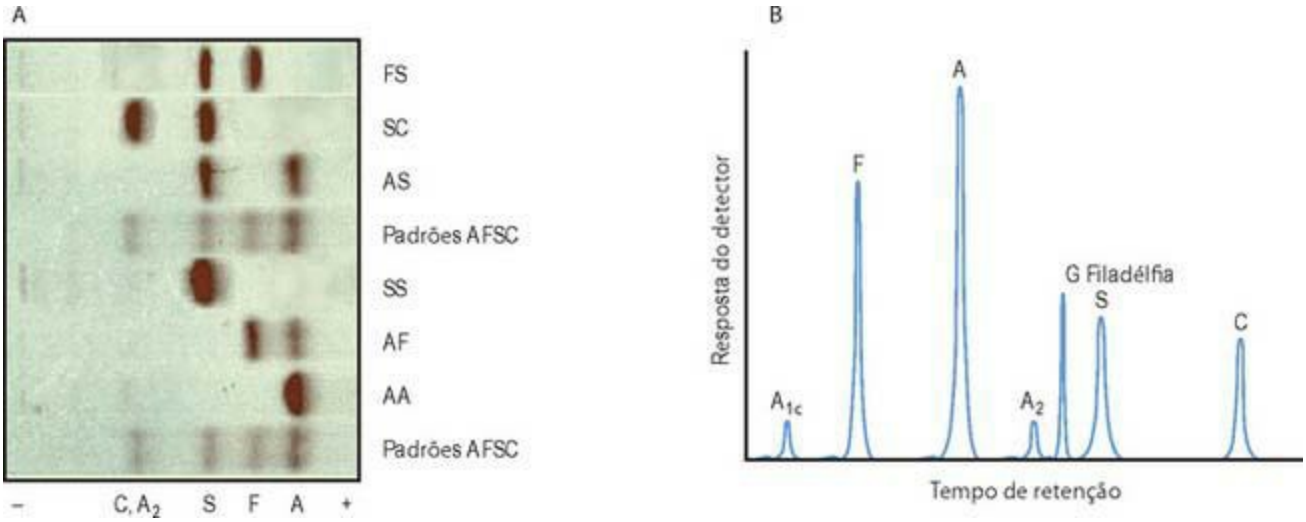


Fig. 5.9 As hemoglobinas normais e anormais podem ser separadas por métodos eletroforéticos e cromatográficos. (A) Esse painel mostra a eletroforese em acetato de celulose (pH 8,4) de amostras de sangue obtidas de triagem neonatal. Essa técnica rápida tentará identificar HbS e HbC, duas hemoglobinas mutantes comuns na população afro-americana. Testes adicionais são necessários para um diagnóstico definitivo. FS, neonato com anemia falciforme; SC, criança duplamente heterozigota com doença semelhante à anemia falciforme; AS, criança com traço falciforme; AF, neonato normal. (B) Esse perfil ilustra a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com uma fase sólida trocadora de cátions, uma técnica capaz de separar e quantificar mais de 40 hemoglobinas. A HPLC também pode ser usada para dosar a HbA_{1c}, uma proteína glicosilada que fornece informações a respeito da progressão e do tratamento do diabetes melito. Também é mostrado o padrão de eluição da Hb G Filadélfia ($Asn^{68(\alpha)} \rightarrow Lys$), uma variante comum porém benigna que comigra com a HbS na eletroforese.

Propriedades do oxigênio

A introdução de O_2 na biosfera terrestre anaeróbica ocorreu há ~$2{,}5 \times 10^9$ anos atrás e chegou a seus níveis atuais de 21% no ar. Na mistura de gases, cada componente faz uma contribuição específica, conhecida como pressão parcial (Lei de Dalton), que é diretamente proporcional à concentração dos gases. Costuma-se usar a pressão parcial de um gás como uma medida de sua concentração em fluidos biológicos. Para o O_2 atmosférico em pressão barométrica (nível do mar) de 760 mmHg ou torr (101,3 kPascal ou kPa; 1 atmosfera absoluta ou ATA), a pressão parcial de oxigênio, pO_2, é 150-160 mmHg. A quantidade de O_2 em solução é, por sua vez, diretamente proporcional à sua pressão parcial. Assim, no sangue arterial (37°C, pH 7,4) a pO_2 é ~100 mmHg, a qual produz uma concentração de O_2 dissolvido de 0,13 mmol/L. Esse nível de O_2 dissolvido, entretanto, é inadequado para garantir um metabolismo aeróbico eficiente.

A maior fração de O_2 transportado no sangue e armazenado nos músculos está complexada com o ferro (ferroso, Fe^{2+}) nas proteínas Hb e Mb, respectivamente. A Hb é uma proteína tetramérica com quatro sítios de ligação ao O_2 (grupos heme). No sangue arterial com concentração de Hb de 150 g/L (2,3 mmol/L) e saturação de O_2 de 97,4%, a contribuição de O_2 ligado à proteína é cerca de 8,7 mmol/L. Essa concentração representa um aumento drástico de 67 vezes sobre o O_2 fisicamente dissolvido. A capacidade total de carreamento de oxigênio do sangue arterial, nas formas dissolvida e ligada à proteína, é ~8,8 mmol/L — quase 200 mL de oxigênio dissolvido por litro de sangue.

CARACTERÍSTICAS DAS PROTEÍNAS GLOBINAS DE MAMÍFEROS

As globinas constituem uma família antiga de metaloproteínas solúveis cujas estruturas e funções têm sido caracterizadas em micro-organismos, plantas, invertebrados e vertebrados. As globinas atuais, com suas diversidades espetaculares de função, provavelmente evoluíram de uma única globina ancestral. Enquanto a dimensão da identidade de aminoácidos entre globinas de invertebrados e de vertebrados varia grandemente e pode parecer frequentemente aleatória, duas características são dignas de atenção: os resíduos invariantes PheCD1 e HisF8 e os padrões característicos dos resíduos hidrofóbicos nos segmentos helicoidais (Fig. 5.1). A Mb humana consiste em um único polipeptídio globina (153 resíduos de aminoácidos, 17.053 Da). A Hb humana é uma molécula tetramérica de dois polipeptídios α-globina (141 resíduos, 15.868 Da) e dois polipeptídios β-globina (146 resíduos, 15.126 Da). Um único grupo prostético heme está associado não covalentemente a cada apoproteína globina.

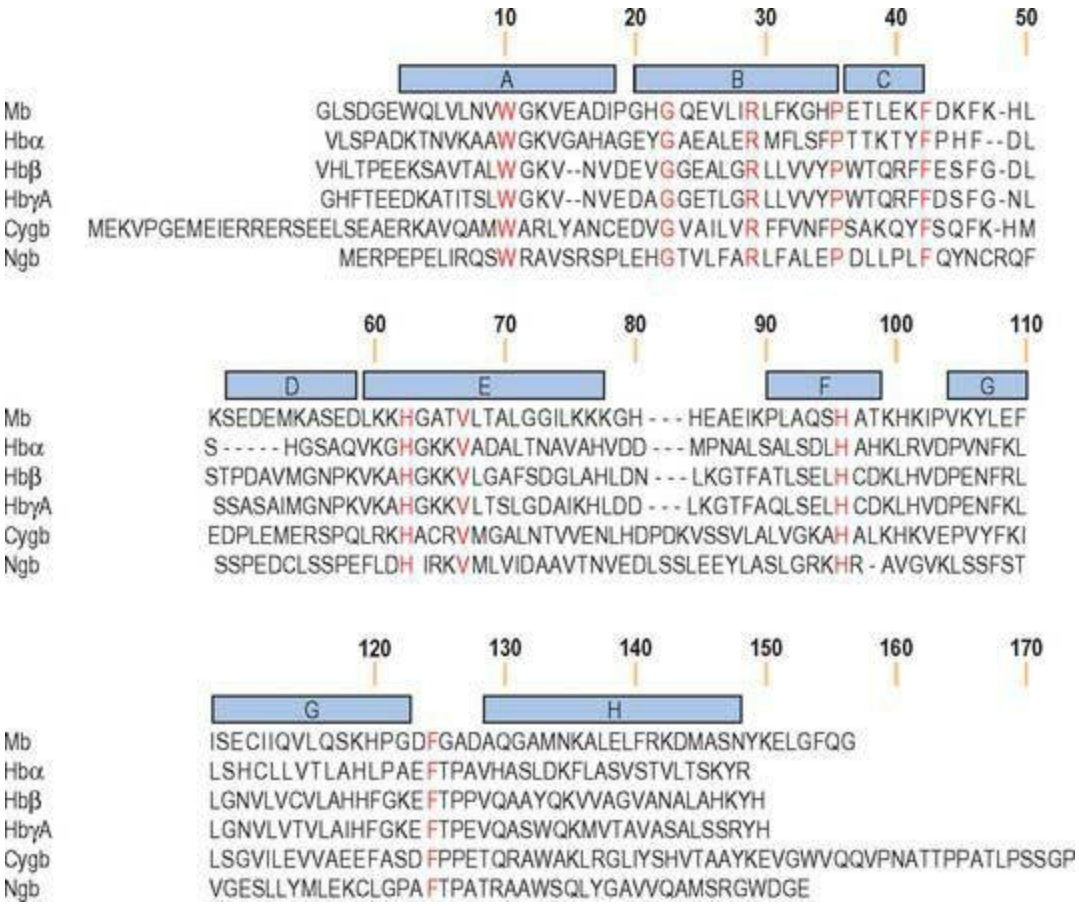


Fig. 5.1 As sequências de aminoácidos das globinas humanas são altamente conservadas. Está representado um alinhamento das globinas humanas, com os resíduos de aminoácidos idênticos em laranja. Os dois resíduos em verde, PheCD1 (F) e HisF8 (H), são absolutamente conservados em todas as globinas metazoárias. Os segmentos helicoidais na mioglobina estão identificados pelas barras azuis. Mb, mioglobina; Hbα, α-globina; Hbβ, β-globina; HbγA, γA-globina; Cygb, citoglobina; Ngb, neuroglobina.

A estrutura secundária das globinas de mamíferos é dominada por uma alta proporção de α-hélice, com mais de 75% dos aminoácidos associados com oito segmentos helicoidais. Essas α-

hélices estão organizadas em uma estrutura terciária altamente empacotada e quase esférica, designada dobras de globina (Fig. 5.2). Essa estrutura terciária é tão universal entre todas as globinas que a nomenclatura convencional para os resíduos de globina segue aquela inicialmente definida para a Mb de cachalote, denominadas hélices A, B, C etc., começando na extremidade *N*-terminal, separadas pelos cantos AB, BC etc., com os resíduos numerados dentro de cada hélice e canto. Por exemplo, o resíduo A14, um aminoácido que participa da estabilização eletrostática entre a hélice A e o canto GH, corresponde a Lys^{15} na Hb de inseto, a Lys^{16} na Mb e na α-globina e Lys^{17} na β-globina (seta, centro inferior, Fig. 5.2).

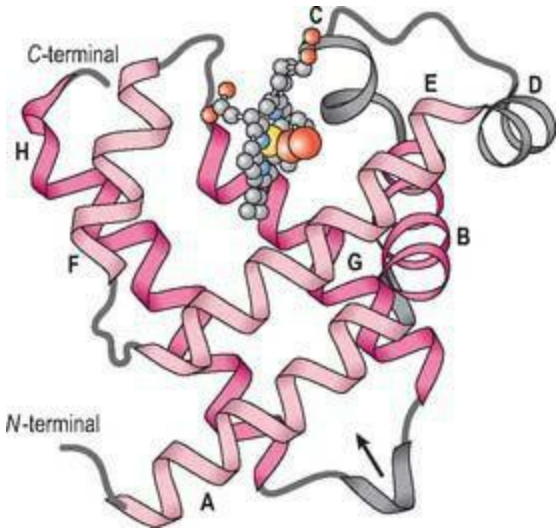


Fig. 5.2 A mioglobina é uma proteína globular compacta. Nessa ilustração da mioglobina de mamífero, somente o esqueleto do polipeptídio globina é mostrado, com ênfase na alta proporção de estrutura secundária (exclusivamente α-hélice). O arranjo de duas camadas, de três em três α-hélices, está destacado pelas tonalidades de vermelho-claro e escuro. O grupo heme está ilustrado como uma estrutura "bola e bastão".

Os aminoácidos polares estão localizados quase exclusivamente na superfície exterior dos polipeptídios globina e contribuem para a alta solubilidade dessas proteínas (p. ex., 370 g/L (5,7 mmol/L) de Hb no eritrócito). Os aminoácidos que são tanto polares quanto hidrofóbicos, como a treonina, a tirosina e o triptofano, estão orientados com seus grupos funcionais na direção do exterior da proteína. Os resíduos hidrofóbicos estão voltados para o interior, onde eles estabilizam a dobradura do polipeptídio e formam uma bolsa que acomoda o grupo prostético heme. Exceções notáveis a essa distribuição geral de resíduos de aminoácidos nas globinas são as duas histidinas que têm papéis indispensáveis dentro da bolsa do heme (Fig. 5.3). As cadeias laterais dessas histidinas estão orientadas perpendicularmente e de cada lado do grupo prostético heme. Um dos nitrogênios do grupo imidazol da cadeia lateral da histidina proximal não variável (HisF8) está próximo o suficiente para ligar-se diretamente ao átomo de Fe^{2+} pentacoordenado. No lado oposto do plano do heme, a histidina distal (HisE7), a qual está muito longe do ferro do heme para a ligação direta, funciona criticamente para estabilizar o O_2 ligado por ponte de hidrogênio.

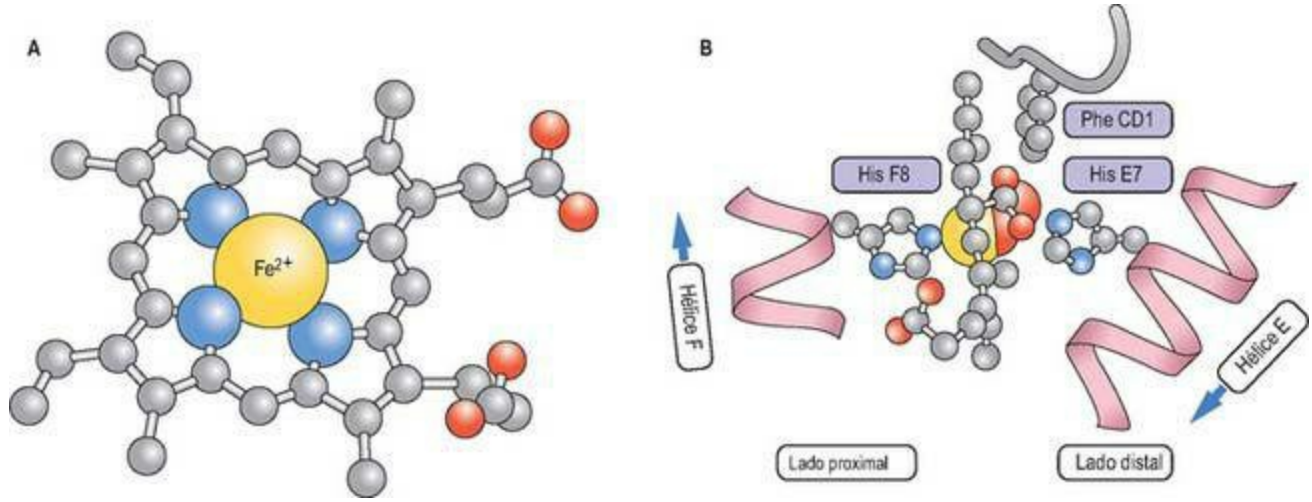


Fig. 5.3 O heme é um complexo de porfirina e ferro. (A) Nessa figura, o esqueleto de carbono da protoporfirina IX, um anel tetrapirrol conjugado, é mostrado em cinza; as moléculas de O_2 estão em vermelho. O ferro (esfera amarela) prefere seis ligantes em uma geometria de coordenação octaédrica; os átomos de nitrogênio pirrólicos (esferas azuis) fornecem quatro deles. A PheCD1 faz interações hidrofóbicas e eletrostáticas empilhadas críticas com o anel porfirínico. (B) Na estrutura da globina oxigenada, o heme planar está posicionado entre as histidinas proximal e distal (HisF8 e HisE7, respectivamente); somente a HisF8 tem um nitrogênio imidazólico (esfera azul) próximo o suficiente para ligar ao ferro. As α-hélices que contêm essas histidinas são mostradas em rosa. Nas globinas desoxigenadas, a sexta posição permanece livre, deixando um ferro pentacoordenado. No estado oxigenado, o O_2 ocupa a sexta posição. Os dois grupos propionato da porfirina participam das interações eletrostáticas e por ponte de hidrogênio com as cadeias laterais da globina e o solvente.

Estrutura do grupo prostético heme

O heme, a porção de ligação ao O_2 comum à Mb e à Hb, é uma molécula porfirínica à qual um átomo de ferro (Fe^{2+}) está coordenado (Fig. 5.3). O grupo prostético Fe-porfirina é planar e hidrofóbico, com exceção de dois grupos propionato que estão expostos ao solvente. O heme se torna um componente integral da holoproteína globina durante a síntese do polipeptídio; é o grupo heme que dá às globinas, assim como ao sangue e ao músculo, suas características de cor vermelho-púrpura — púrpura no estado desoxigenado, vermelho no estado oxigenado.

As globinas aumentam a solubilidade em água do grupo prostético heme de outra forma pouco solúvel, hidrofóbico. Uma vez sequestrado dentro de uma bolsa hidrofóbica criada pelo peptídeo de globina empacotado, o heme está em um ambiente protetor que minimiza a oxidação espontânea do Fe^{2+} a Fe^{3+} (enferrujando) na presença de O_2. Tal ambiente é também essencial para as globinas ligarem e liberarem O_2. Se o átomo de ferro se tornasse oxidado ao estado férrico, o heme não mais poderia interagir reversivelmente com o O_2, comprometendo sua função no armazenamento e transporte de O_2.

Mioglobina: uma proteína de armazenamento de oxigênio

Localizada no citosol das células musculares esqueléticas e cardíacas e de algumas do músculo liso, a Mb liga o O_2 que foi liberado pela Hb nos capilares teciduais e subsequentemente difundido nos tecidos. Esse O_2 armazenado está prontamente disponível para as organelas, particularmente as mitocôndrias, que realizam o metabolismo oxidativo. Com seu único sítio de ligação ao ligante, a reação reversível da Mb com o O_2:

$$Mb + O_2 \rightleftharpoons Mb \bullet O_2$$

pode ser descrita pelas equações seguintes:

$$K_a = [Mb \bullet O_2]/[Mb][O_2]$$

$$Y = [Mb \bullet O_2]/\{[Mb \bullet O_2] + [Mb]\}$$

onde K_a é a constante de afinidade ou de equilíbrio e Y é a saturação fracional de O_2. Combinando essas duas equações, expressando a concentração de O_2 em termos de sua pressão parcial pO_2 e substituindo o termo P_{50} por $1/K_a$ geramos a equação para a curva de saturação por O_2 da Mb:

$$Y = pO_2/\{pO_2 + P_{50}\}$$

TERAPIA HIPERBÁRICA DE O_2 PARA O ENVENENAMENTO AGUDO POR MONÓXIDO DE CARBONO

Uma gestante de 22 anos de idade, com um feto de 31 semanas, foi levada à maternidade de um hospital com suspeita de envenenamento por CO. A paciente apresentava dor de cabeça, náusea e anormalidades visuais. Ela declarou que seu local de trabalho tinha sofrido reparos nos sistemas de aquecimento e ventilação durante as duas últimas semanas e que, no dia de sua visita ao hospital, o corpo de bombeiros havia evacuado o prédio após detectar alto nível de CO (200 ppm), comparado com um nível urbano típico de 10 ppm. Os sinais vitais eram pressão sanguínea de 116/68 mmHg, pulsação de 100 e velocidade respiratória de 24. Digno de nota na avaliação da paciente foi um conteúdo de carboxi-hemoglobina (Hb:CO) de 15% da Hb total no momento da admissão (normal = 3%, mas pode exceder 10% em fumantes pesados). O monitoramento fetal indicava frequência cardíaca de 135, com irregularidades ocasionais e moderadas. As contrações uterinas estavam ocorrendo a cada 3-5 min. A paciente foi tratada na câmara de O_2 hiperbárica do hospital: 30 min em 2,5 ATA, seguidos de 60 min em 2,0 ATA. Ela também recebeu sulfato de magnésio intravenoso para resolver as contrações prematuras. A paciente foi liberada dois dias depois. Ela deu à luz uma menina saudável com 38 semanas de idade gestacional e que, no exame ao nascimento e com seis semanas de idade, não exibia sequelas aparentes da sua exposição *in utero* ao CO e a 100% de O_2.

Comentário. O monóxido de carbono é um produto normal do catabolismo do heme e tem uma

série de atividades fisiológicas nos sistemas vascular, neuronal e imunológico. Como o O_2, o CO se liga aos grupos prostéticos heme. Como a afinidade do heme ligado à globina para o CO é cerca de 250 vezes aquela para o O_2, a exposição prolongada da hemoglobina ao CO exógeno seria praticamente irreversível ($t_{½}$ para a reversão no sangue ~4-8 horas) e levaria a níveis altamente tóxicos de carboxi-Hb. O O_2 hiperbárico é o tratamento de escolha para o envenenamento por CO severo ou complicado. A administração de O_2 100% em 2-3 ATA cria valores de pO_2 arterial e tecidual de 2.000 mmHg e 400 mmHg, respectivamente (~20 vezes o normal). O resultado imediato é uma redução na $t_{½}$ da carbóxi-Hb para menos de 30 min. O O_2 hiperbárico é também usado no tratamento de doença de descompressão, embolia gasosa arterial, lesão tecidual induzida por radiação ou isquêmica e hemorragia severa (compare com o quadro da pág. 523).

Por definição, a constante P_{50} é o valor de pO_2 no qual $Y = 0,5$ ou metade dos sítios ligantes está ocupada (saturados pelo O_2). Em um gráfico de Y contra pO_2, a equação para a ligação do ligante na Mb descreve uma hipérbole (Fig. 5.4) com uma P_{50} de 4 mmHg. O baixo valor de P_{50} reflete alta afinidade pelo O_2. Nos leitos capilares dos tecidos musculares, os valores de pO_2 estão na faixa de 20-40 mmHg. De forma previsível, os músculos em exercício exibem menores valores de pO_2 do que os músculos em repouso. Com essa alta afinidade pelo O_2, a Mb do miócito torna-se prontamente saturada com o O_2 que chegou do sangue. Como o O_2 é consumido durante o metabolismo aeróbico, o O_2 se dissocia da Mb por ação das massas e se difunde na mitocôndria, a estação de força da célula muscular.

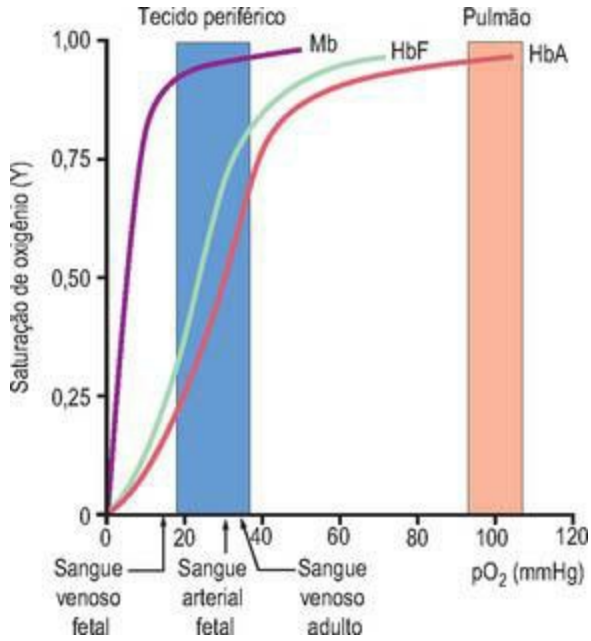


Fig. 5.4 As curvas de saturação da mioglobina e da hemoglobina. Mb e Hb têm diferentes curvas de saturação. A saturação fracional (Y) dos sítios de ligação ao O_2 está representada contra a concentração de O_2 (pO_2 (mmHg)). Curvas são mostradas para a Mb, Hb fetal (HbF) e Hb de adulto (HbA). Também estão indicados por setas e sombreamentos os níveis normais de O_2 medidos em várias amostras de sangue de adultos e fetos.

Hemoglobina: uma proteína transportadora de oxigênio

A Hb é a principal proteína transportadora de O_2 no sangue humano; ela está localizada exclusivamente nos eritrócitos. A Hb adulta (HbA) é um arranjo tetraédrico de duas subunidades de α-globinas idênticas e duas β-globinas idênticas, uma geometria que permite vários tipos de interações subunidade-subunidade na estrutura quaternária (Fig. 5.5). Importante é que, dentro da Hb tetraédrica, cada subunidade está em contato com as outras três. A análise experimental da estrutura quaternária indica múltiplas interações não covalentes (pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas) entre cada par de subunidades não similares, isto é, nas interfaces α-β. Em contraste, existem menos interações, e predominantemente hidrofóbicas, entre subunidades idênticas nas interfaces α_1-α_2 ou β_1-β_2. O número real e a natureza dos contatos diferem na presença ou ausência de O_2 e de efetores alostéricos. As associações fortes em cada heterodímero αβ e a interface entre os dois heterodímeros (Fig. 5.5) são agora reconhecidas como os principais fatores que determinam a ligação e a liberação de O_2. Portanto, a Hb é considerada mais apropriadamente como um dímero de heterodímeros, $(\alpha\beta)_2$, do que como um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$. Embora uma solução de HbA seja teoricamente uma mistura dinâmica de heterodímeros e tetrâmeros, sob condições fisiológicas (alta Hb e pH neutro) o equilíbrio favorece grandemente o tetrâmero: > 99% para a Hb oxigenada, > 99,9% para a Hb desoxigenada.

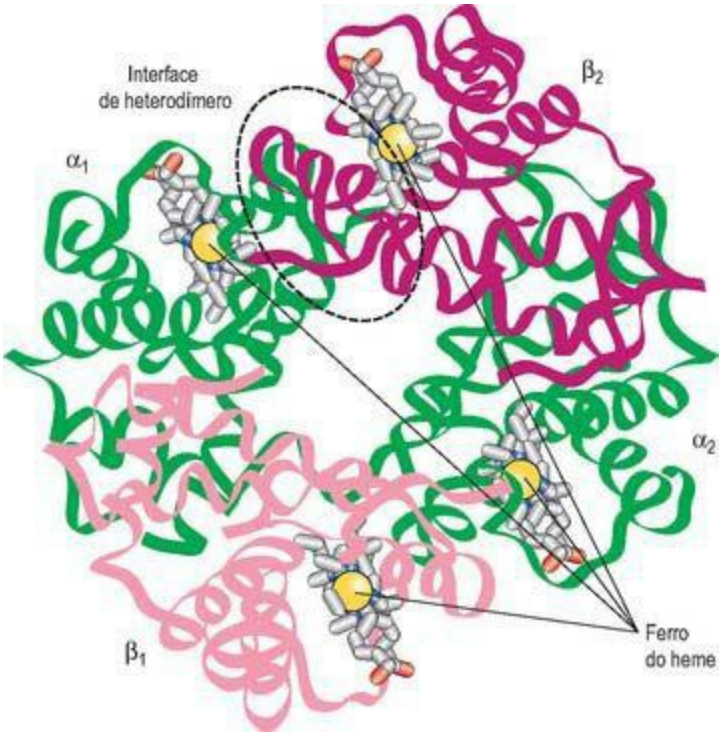


Fig. 5.5 A hemoglobina é um tetrâmero de quatro subunidades de globina. A Hb é um complexo tetraédrico de duas α-globinas idênticas (α_1 e α_2, em verde) e duas β-globinas idênticas (β_1 e β_2, em vermelho). Com essa geometria, cada subunidade de globina faz contato com outras três subunidades, criando as interfaces e interações que definem cooperatividade. Uma dessas interfaces de heterodímero está contornada por um tracejado oval.

Interações da hemoglobina com o oxigênio

Como um veículo de liberação de gás, a Hb precisa ser capaz de ligar O_2 eficientemente quando entra no alvéolo pulmonar durante a respiração e de liberar O_2 para o ambiente extracelular com eficiência similar ou quando o eritrócito circula através dos capilares teciduais. Essa dualidade de função excepcional é alcançada pelas interações cooperativas entre as subunidades globinas. Quando a Hb desoxigenada se torna oxigenada, alterações estruturais significantes se estendem por toda a molécula da proteína. Na bolsa do heme, como consequência da coordenação do O_2 com o ferro e uma nova orientação dos átomos na estrutura do heme, a histidina proximal e a hélice F à qual ela pertence mudam suas posições (Fig. 5.3). Essa mudança conformacional sutil desencadeia realinhamentos estruturais maiores em outros lugares na subunidade globina. Em sequência, essas alterações estruturais terciárias são transmitidas, até amplificadas, na estrutura quaternária como um todo, de tal forma que ocorre uma rotação de 12-15° e um deslocamento de 0,10 nm do dímero $\alpha_1\beta_1$ em relação ao dímero $\alpha_2\beta_2$. Devido à assimetria inerente do tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, esses movimentos combinados resultam em alterações bastante drásticas dentre e principalmente entre os heterodímeros αβ. Devido às alterações estruturais na hemoglobina, como resultado da ligação de oxigênio e outros efetores, a afinidade de ligação para as moléculas subsequentes de oxigênio pode ser aumentada (cooperatividade positiva) ou diminuída (cooperatividade negativa).

A Hb pode ligar até quatro moléculas de O_2. Com seus múltiplos sítios de ligação ao ligante e alterações estruturais em resposta à ligação, a afinidade pelo oxigênio e a saturação fracional da Hb são funções mais complexas do que aquelas da Mb. Consequentemente, a equação para a curva de saturação pelo O_2 fracional deve ser modificada para:

$$Y = pO_2^{\,n}/\{pO_2^{\,n} + P_{50}^{\,n}\}$$

onde n é o coeficiente de Hill. Em um gráfico de Y contra pO_2 quando $n > 1$, a equação para a ligação do ligante descreve uma curva sigmoide (em forma de S) (Fig. 5.4). O coeficiente de Hill, determinado experimentalmente, é uma medida de cooperatividade entre sítios de ligação do ligante, isto é, a extensão na qual a ligação de O_2 com uma subunidade influencia a afinidade do O_2 com outras subunidades. Para a ligação cooperativa completa, n é igual ao número de sítios, uma indicação de que a ligação a um sítio aumenta maximamente a ligação a outros sítios na mesma molécula. O coeficiente de Hill normal para a Hb de adulto (n ~2,7) reflete fortemente a cooperatividade de ligação. A Hb tem afinidade consideravelmente menor pelo O_2, refletida em uma P_{50} de 27±2 mmHg, comparada com a mioglobina (P_{50} = 4 mmHg). Na ausência de cooperatividade, mesmo com múltiplos sítios, o coeficiente de Hill seria 1, ou seja, a ligação de uma molécula de O_2 não influenciaria a ligação de outras moléculas. A cooperatividade diminuída ou ausente é observada em Hb mutantes que perderam os contatos subunidade-subunidade funcionais (Tabela 5.1). O aclive da curva de saturação da Hb ocorre em uma faixa de pO_2 que é encontrada na maioria dos tecidos (Fig. 5.4). Portanto, alterações relativamente pequenas na pO_2 resultarão em alterações consideravelmente maiores na interação da Hb com o O_2. Da mesma forma, deslocamentos sutis da curva para qualquer direção influenciarão drasticamente a afinidade pelo O_2.

Tabela 5.1 Classificação e exemplos de hemoglobinopatias. As hemoglobinopatias são normalmente classificadas de acordo com a alteração mais proeminente na estrutura, na função ou na regulação da proteina. A identificação inicial de uma mutação frequentemente envolve a análise eletroforética ou cromatográfica, como mostrado na Figura 5.9 para a HbSC, um genótipo duplo heterozigoto associado com um fenótipo de uma doença semelhante à anemia falciforme. A = mutante por deleção

Classificação	Nome comum	Mutação	Frequência	Alterações bioquímicas	Consequências clínicas
Solubilidade anormal	HbC	$Glu^{6(\beta)} \rightarrow Lys$	comum	cristalização celular da proteína oxigenada; fragilidade aumentada	anemia hemolítica moderada; esplenomegalia (baço aumentado)
Afinidade pelo O_2 diminuída	Hb Titusville	$Asp^{94(\alpha)} \rightarrow Asn$	muito rara	interface do heterodímero alterada para estabilizar o estado T; cooperatividade diminuída	cianose discreta (coloração da pele azul-púrpura pelo sangue desoxigenado)
Afinidade pelo O_2 aumentada	Hb Helsinki	$Lys^{82(\beta)} \rightarrow Met$	muito rara	ligação do 2,3-BPG diminuída no estado T	policitemia moderada (aumento na contagem de eritrócitos)
Heme férrico (meta-hemoglobina)	HbM Boston	$His^{58(\alpha)} \rightarrow Tyr$	ocasional	bolsa do heme alterada (mutação na His distal)	cianose da pele e membranas mucosas; efeito Bohr diminuído
Proteína instável	Hb Gun Hill	Δβ91-95	muito rara	perda do enovelamento causada pela perda da Leu na bolsa do heme e hélice encurtada	formação de corpos de Heinz (inclusões de Hb desnaturada); icterícia (coloração amarelada da pele e da esclera); urina pigmentada
Síntese anormal	Hb Constant Spring	$ter^{142(\alpha)} \rightarrow Gln$	muito rara	perda do códon de terminação; estabilidade do mRNA diminuída	α-talassemia (anemia hemolítica, esplenomegalia e icterícia)

O mecanismo que fundamenta a cooperatividade na ligação do oxigênio pela hemoglobina envolve uma mudança entre dois estados conformacionais da molécula da hemoglobina, a qual difere na afinidade pelo oxigênio. Essas duas conformações quaternárias são conhecidas como estados T (tenso) e R (relaxado), respectivamente. No estado T, as interações entre os heterodímeros são mais fortes; no estado R, essas ligações não covalentes são, no total, mais fracas. A afinidade pelo O_2 é menor no estado T e maior no estado R. A transição entre essas estruturas é acompanhada pelo rompimento das ligações não covalentes existentes e a formação de novas nas interfaces dos heterodímeros (Fig. 5.6). O contato entre os dois heterodímeros αβ (Fig. 5.5) é estabilizado por uma mistura de pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas. Aproximadamente 30 aminoácidos participam das interações não covalentes que caracterizam as conformações da Hb desoxigenada e oxigenada.

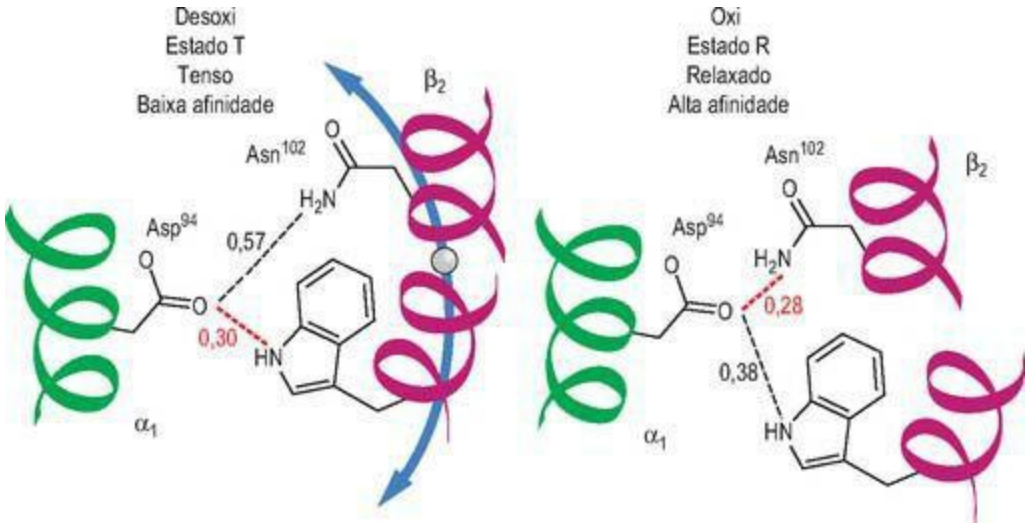


Fig. 5.6 As ligações não covalentes diferem na hemoglobina oxigenada e não oxigenada. No meio da interface entre os dois

heterodímeros αβ estão os resíduos $Asp^{94(\alpha)}$ na α_1-globina de um heterodímero e $Trp^{37\beta)}$ e $Asn^{102(\beta)}$ na β_2-globina de outro heterodímero (tracejado oval na Figura 5.5). Cada um deles tem átomos na cadeia lateral capazes de interações não covalentes. (Esquerda) No estado T, desoxigenado, a distância entre os resíduos de Asp e Trp favorecem a ponte de hidrogênio, enquanto a distância entre Asp e Asn é muito grande. (Direita) Como resultado das mudanças conformacionais que acompanham a transição para o estado R, oxigenado, a distância entre Asp e Trp é agora muito grande, mas aquela entre Asp e Asn é compatível com a formação de uma nova ponte de hidrogênio. Em outros locais ao longo dessa interface, outras ligações são criadas e desfeitas. Um alinhamento idêntico de resíduos e interações não covalentes é encontrado entre os monômeros de globinas α_2 e β_1. As distâncias são mostradas em nm. As pontes de hidrogênio têm comumente 0,27-0,31 nm de comprimento.

Vários modelos têm sido desenvolvidos para descrever a transição entre os estados T e R da hemoglobina. Em um extremo está um modelo no qual cada subunidade de Hb responde sequencialmente à ligação do O_2 com uma mudança conformacional, permitindo, assim, intermediários híbridos dos estados T e R. No extremo oposto está um modelo no qual todas as quatro subunidades mudam ao mesmo tempo; os estados híbridos não existem, e a ligação do O_2 muda o equilíbrio entre os estados T e R. As estruturas moleculares da Hb desoxigenada e parcial e completamente ligada têm sido extensivamente estudadas através de uma ampla gama de técnicas termodinâmicas e cinéticas. Até o momento, a tendência do progresso de conciliar as inconsistências entre os modelos clássicos e os mais recentes tem sido lenta.

OXIMETRIA DE PULSO

A oximetria de pulso ("*pulse-ox*") é um método não invasivo para estimar a saturação pelo oxigênio da Hb arterial. Dois princípios físicos estão envolvidos: primeiro, as características espectrais nas luzes visível e infravermelha da oxi-Hb e da desoxi-Hb são diferentes; segundo, o fluxo do sangue arterial tem um componente pulsátil que resulta de alterações de volume com cada batida do coração. As dosagens de transmissão ou reflectância são feitas em um tecido translúcido com fluxo sanguíneo razoável, comumente um dedo da mão ou do pé, ou orelha, de adultos e crianças, ou pé ou mão em bebês. O fotodetector e o microprocessador do oxímetro de pulso permitem um cálculo da saturação pelo oxigênio (SpO_2 = saturação do oxigênio periférico) que tipicamente está em 4-6% do valor encontrado pela análise gasosa do sangue arterial. A oximetria de pulso é usada para monitorar o estado cardiopulmonar durante a anestesia local e geral, nas unidades de tratamento intensivo e neonatal, e durante o transporte do paciente. Os movimentos do corpo, a luz ambiente irradiada, a bilirrubina aumentada, as unhas postiças ou pintadas podem interferir na oximetria de pulso. Convencionalmente, instrumentos com dois comprimentos de onda "assumem" que as dosagens óticas estão associadas com as hemoglobinas oxigenadas e desoxigenadas; eles não podem discriminar entre oxi-, desoxi- e met-Hb. Tecnologias mais novas, entretanto, utilizam seis ou oito comprimentos de onda e permitem a discriminação de múltiplas espécies de Hb com uma exatidão de ±2,0% e uma precisão de ±1,0%.

MODULAÇÃO ALOSTÉRICA DA AFINIDADE DA HEMOGLOBINA PELO OXIGÊNIO

Proteínas alostéricas e efetores

A Hb é um dos exemplos mais bem estudados de proteína alostérica, uma proteína que exibe alterações na afinidade pelo ligante (ou substrato) sob a influência de pequenas moléculas (Cap. 6 e Fig. 6.11). Essas pequenas moléculas, denominadas efetores alostéricos (significando outro local ou sítio), ligam-se às proteínas em sítios que são diferentes espacialmente dos sítios de ligação do ligante. Através de efeitos conformacionais de longo alcance, eles alteram a afinidade de ligação ao ligante ou ao substrato da proteína. As proteínas alostéricas são tipicamente proteínas multissubunidades. A afinidade de ligação ao O_2 da Hb é afetada positivamente pelo O_2, assim como por vários efetores alostéricos quimicamente diferentes, incluindo H^+, CO_2 e 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) (Fig. 5.7). Quando um efetor alostérico afeta sua própria ligação à proteína (em outro sítio), o processo é denominado homotrópico; por exemplo, o efeito da ligação do O_2 em um sítio da Hb aumenta a afinidade para a ligação de O_2 em outros sítios na Hb. Quando o efetor alostérico é diferente do ligante cuja ligação é alterada, o processo é denominado heterotrópico; por exemplo, o efeito do H^+ sobre a P_{50} para a ligação do oxigênio à Hb. Essas interações levam a deslocamentos horizontais nas curvas de ligação ao O_2 (Fig. 5.7).

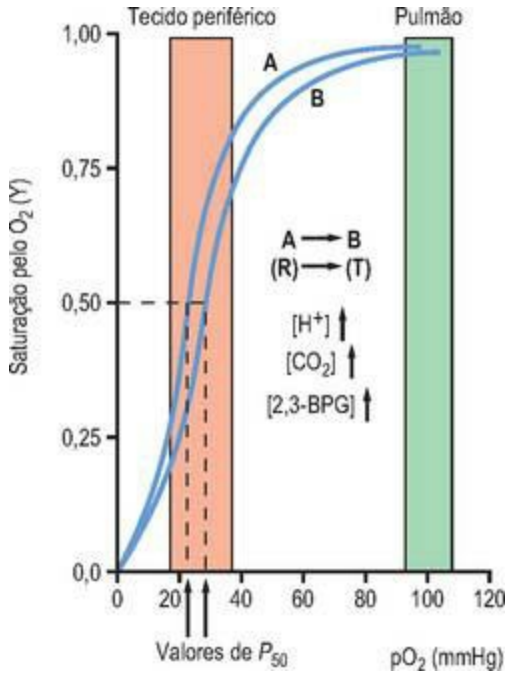


Fig. 5.7 Os efetores alostéricos diminuem a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. A interação do O_2 com a Hb é regulada por efetores alostéricos. Em condições fisiológicas, a HbA exibe uma curva de saturação pelo O_2 altamente cooperativa. Com um aumento na concentração no eritrócito de qualquer um dos três efetores alostéricos, H^+, CO_2 ou 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG), a curva se desloca para a direita (posição B), indicando uma afinidade diminuída pelo O_2 (aumento no valor de P_{50}). As ações dos efetores que modulam a afinidade pelo O_2 parecem ser aditivas. De modo oposto, um decréscimo em qualquer um dos efetores alostéricos desloca a curva para a esquerda (posição A). O aumento da temperatura também desloca a curva para a direita. A sensibilidade da saturação pelo O_2 ao H^+, é conhecida como efeito Bohr. As faixas normais de O_2 medidas nos capilares pulmonares e dos tecidos periféricos estão indicadas pelas áreas sombreadas.

Efeito Bohr

A afinidade da Hb pelo oxigênio é excepcionalmente sensível ao pH, um fenômeno conhecido como efeito Bohr. O efeito Bohr é mais bem descrito como um deslocamento para a direita na curva de saturação pelo O_2 com o decréscimo do pH. Portanto, uma concentração aumentada de H^+ (pH diminuído) favorece uma P_{50} aumentada (afinidade menor) para a ligação do O_2 com a Hb, equivalente a um deslocamento dependente de H^+ da Hb do estado R para o estado T.

Para entender o efeito Bohr no nível estrutural da proteína e para estimar o papel do H^+ como um efetor alostérico heterotrópico, é importante lembrar que a Hb é uma molécula altamente carregada. Os resíduos que participam do efeito Bohr incluem o grupo amino da Val *N*-terminal da α-globina e a cadeia lateral da His *C*-terminal da β-globina. Os valores de pK_a desses ácidos fracos diferem suficientemente entre as formas desoxigenadas e oxigenadas da Hb para causar a captação de 1,2-2,4 prótons pelo tetrâmero desoxigenado, comparado ao oxigenado.

A identificação de resíduos de aminoácidos específicos das α e β-globinas que participam no efeito Bohr é complicada pelas interações diferenciais de outros solutos carregados com a desoxi-Hb e com a oxi-Hb. Portanto, a ligação preferencial de um dado ânion, isto é, Cl^- e/ou fosfatos orgânicos, à Hb desoxigenada envolve a alteração dos p*K*s de alguns grupos catiônicos, contribuindo dessa forma para o efeito Bohr observado como um todo. Por exemplo, existem fortes evidências mostrando que a $Val^{1(\alpha)}$ é relevante para o efeito Bohr somente na presença de Cl^-. O pK_a desse grupo muda de 8,0 na Hb desoxigenada para 7,25 na Hb ligada na presença de Cl^- fisiológico (~100 mmol/L). Além disso, a participação dos grupos $Val^{1(\alpha)}$ no efeito Bohr dependente de cloreto é fortemente modulada pelo CO_2 devido à formação de adutos de CO_2 (carbamino) na Hb (a seguir).

À medida que a Hb liga O_2, prótons se dissociam de grupos funcionais de ácidos fracos selecionados. Ao contrário, em meio ácido, a protonação de bases conjugadas inibe a ligação do O_2. Durante sua circulação entre os alvéolos pulmonares e os capilares de tecidos periféricos, os eritrócitos encontram condições marcadamente diferentes de pO_2 e pH. A alta pO_2 nos pulmões promove a saturação pelo ligante e força os prótons da molécula de Hb a estabilizarem o estado R. No leito capilar, particularmente em tecidos metabolicamente ativos, o pH é levemente mais baixo devido à produção de metabólitos ácidos, tais como o lactato. A Hb oxigenada, ao entrar nesse ambiente, irá adquirir alguns prótons em "excesso" e mudar para o estado T, promovendo a liberação de O_2 para a captação pelos tecidos para o metabolismo aeróbico.

Efeitos do CO_2 e da temperatura

A capacidade do CO_2 de alterar a afinidade da Hb pelo O_2 está intimamente relacionada ao efeito Bohr. Como o efeito alostérico negativo do H^+, o aumento na pCO_2 nos capilares venosos diminui a afinidade da Hb pelo O_2. Consequentemente, ocorre um deslocamento para a direita na curva de saturação pelo ligante à medida que a pCO_2 aumenta. Deve ser enfatizado que o efetor alostérico é, de fato, o CO_2, e não o HCO_3^-. O CO_2 reage reversivelmente com os grupos amino *N*-terminais desprotonados dos polipeptídios globina para formar adutos carbamino:

$$Hb—NH_2 + CO_2 \rightleftharpoons Hb—NHCOO^- + H^+$$

Essa modificação química covalente transiente da Hb não é somente um exemplo especializado de controle alostérico, resultando na estabilização da Hb desoxigenada; ele também representa uma forma de transporte de CO_2 para os pulmões para eliminá-lo do corpo. Entre 5-10% do conteúdo total de CO_2 do sangue existe como adutos carbamino.

Existe uma forte correlação fisiológica entre pCO_2 e a afinidade da Hb pelo O_2. O CO_2 é o principal produto da oxidação mitocondrial e, assim como o H^+, é particularmente abundante em tecidos metabolicamente ativos. Uma vez se difundindo no sangue, o CO_2 pode reagir com a Hb oxigenada, deslocar o equilíbrio na direção do estado T e, dessa forma, promover a dissociação do O_2 ligado (Fig. 5.7). A grande maioria do CO_2 do tecido periférico está, entretanto, na presença de anidrase carbônica do eritrócito, hidratado a ácido carbônico (H_2CO_3), um ácido fraco que se dissocia parcialmente em H^+ e HCO_3^-:

$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$ reação catalisada por enzima

$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$ dissociação espontânea do ácido

HEMOGLOBINAS ARTIFICIAIS

As curvas de oferta e procura do sangue total e a disponibilidade e a utilização das células vermelhas embaladas apontam para uma crise iminente e a necessidade de desenvolver alternativas. Substitutos para as células vermelhas são as transfusões, alternativas potencialmente úteis durante procedimentos cirúrgicos grandes e em emergências de choque hemorrágico. Três tipos de carreadores de O_2 artificiais têm sido investigados: o carreador de oxigênio à base de Hb (HBOC), a Hb encapsulada em lipossoma e a emulsão de perfluorocarbono. Os HBOCs são hemoglobinas derivadas de fontes alogênicas, xenogênicas ou recombinantes, que têm sido modificadas por polimerização, ligação cruzada ou conjugação. Essas modificações facilitam a purificação e a esterilização e minimizam a toxicidade e a imunogenicidade. Elas também são importantes para estabilizar os tetrâmeros de Hb acelulares; de outra forma, a hemoglobina se dissocia em dímeros e monômeros no plasma e é excretada na urina.

Vários HBOCs têm progredido através de avaliação clínica extensiva. Um deles é o HBOC-201, uma Hb bovina polimerizada com glutaraldeído, que tem recebido aprovação para uso humano na

África para a anemia aguda secundária a procedimentos cirúrgicos. Uma Hb humana polimerizada e piridoxilada está em estudos de fase 3 nos Estados Unidos, mas preocupações têm surgido com relação à segurança do produto e a protocolos éticos. Um HBOC conjugado, no qual o polietilenoglicol está ligado a resíduos de Lys na superfície da Hb humana, teve a investigação de fase 2 completa. As formas polimerizadas têm afinidade pelo O_2 (P_{50}) na faixa de 16-38 mmHg e cooperatividade diminuída (n ~1,3-2,1); a Hb conjugada exibe uma afinidade pelo O_2 muito alta (5-6 mmHg), um coeficiente de Hill de 1,2 e metade do efeito Bohr da Hb nativa.

Efeitos adversos não são incomuns com HBOCs. Ocorre vasoconstricção aumentada com hipertensão subsequente, um resultado da ligação aumentada do óxido nítrico (NO) pela Hb acelular e estimulação alterada da liberação de catecolamina. Outros problemas incluem a oxidação do heme a met-Hb aumentada, deposição de ferro nos tecidos elevada, desconforto gastrointestinal, neurotoxicidade e interferência nas dosagens diagnósticas. A engenharia genética da Hb humana, que agora está em curso em vários laboratórios, visa melhorar a ligação do O_2, as propriedades alostéricas e os efeitos colaterais dos HBOCs.

De forma interessante, um *pool* adicional de prótons é gerado a partir da formação de aduto carbamino e das reações de hidratação/dissociação envolvendo CO_2, os prótons que se tornam disponíveis para participar do efeito Bohr e facilitar a troca O_2—CO_2. Durante seu retorno aos pulmões, o sangue transporta duas formas de CO_2: carbamino-Hb e o par acidobase conjugada H_2CO_3/HCO_3^-. O sangue e a Hb estão agora expostos a uma baixa pCO_2 e, através da ação das massas, a formação de aduto carbamino é revertida e a ligação de O_2 é novamente favorecida. Similarmente, nos capilares pulmonares, a anidrase carbônica dos eritrócitos converte H_2CO_3 a CO_2 e H_2O, que são expirados para a atmosfera.

Os músculos em exercício não produzem somente os efetores alostéricos H^+ e CO_2 como produtos do metabolismo aeróbico, mas também liberam calor. Como a ligação de O_2 ao heme é um processo exotérmico, a afinidade da Hb pelo O_2 diminui com o aumento na temperatura. Portanto, o microambiente de um músculo em exercício favorece profundamente uma liberação mais eficiente de O_2 ligado à Hb no tecido circundante.

Efeito do 2,3-bifosfoglicerato

O 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG), um composto fosfatado orgânico, é outro importante modulador da afinidade da Hb pelo O_2. O 2,3-BPG é sintetizado nos eritrócitos humanos em um desvio de uma etapa da via glicolítica (Cap. 12). Como o H^+ e o CO_2, o 2,3-BPG é um efetor alostérico negativo indispensável que, quando ligado à Hb, causa um aumento marcante na P_{50} (Fig. 5.7). Se não fosse pela alta concentração no eritrócito de 2,3-BPG (~4,1 mmol/L, quase a mesma da Hb), a curva de saturação da Hb pelo O_2 se aproximaria daquela da Mb!

Em uma extremidade do eixo de simetria bipolar, dentro da estrutura quaternária da Hb, existe uma fenda rasa definida por aminoácidos catiônicos de subunidades β-globina justapostas (Fig. 5.8). Uma única molécula de 2,3-BPG liga-se a esse sítio. Uma consequência crítica das diferenças conformacionais entre os estados T e R é que a Hb desoxigenada interage preferencialmente com o 2,3-BPG negativamente carregado. Interações eletrostáticas múltiplas estabilizam o complexo entre o efetor polianiônico e a Hb desoxigenada. A fenda é muito estreita na Hb totalmente oxigenada para acomodar o 2,3-BPG.

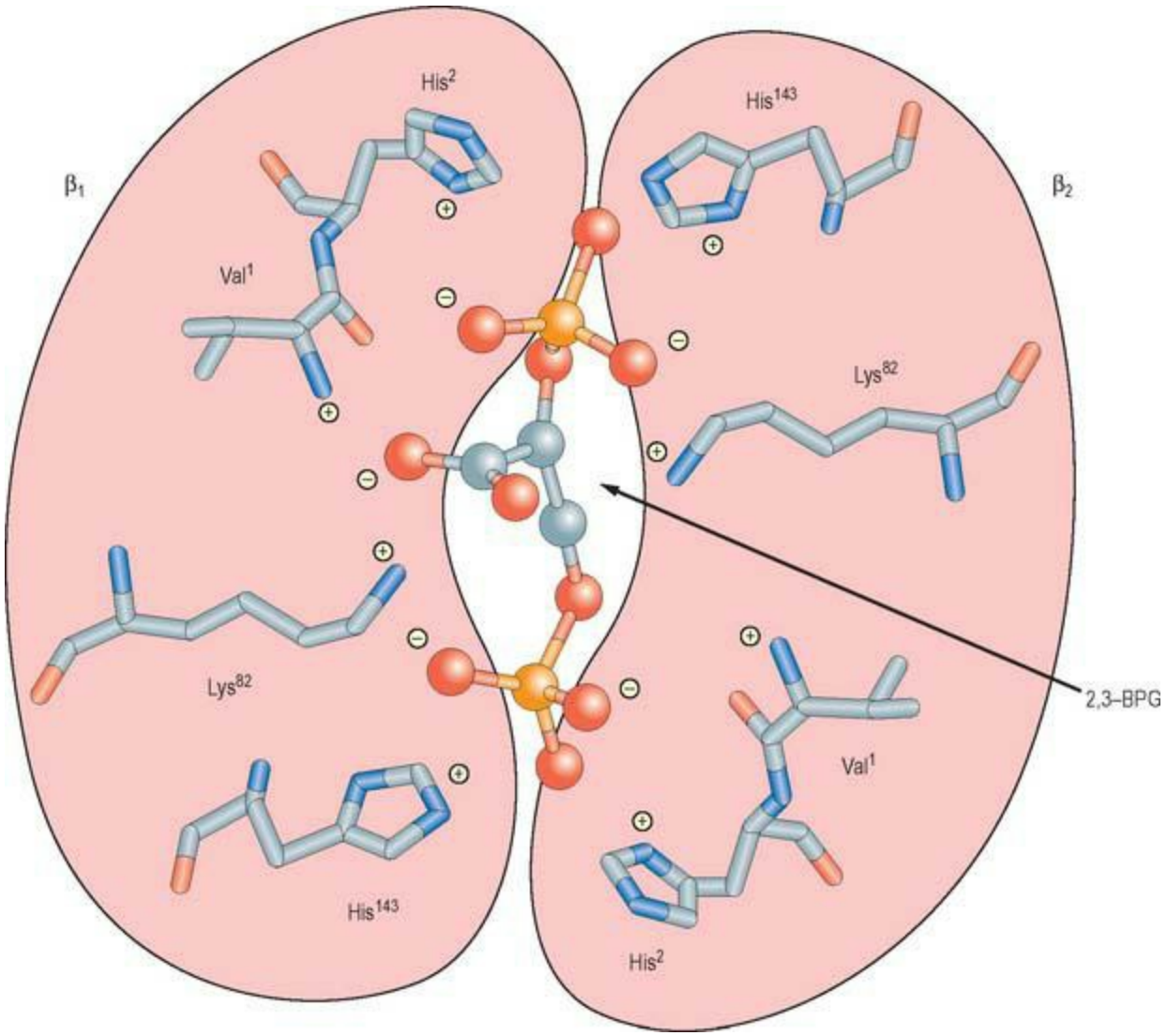


Fig. 5.8 O 2,3-bifosfoglicerato liga-se preferencialmente à hemoglobina desoxigenada. Na superfície do tetrâmero da Hb desoxigenada, onde duas β-globinas (púrpura) interagem, existe uma fenda formada pelo resíduo de aminoácido *N*-terminal ($Val^{1(\beta)}$) e as

cadeias laterais da $His^{2(\beta)}$, $Lys^{82(\beta)}$ e $His^{143(\beta)}$ (modelos em bastão). Esse sítio consiste em oito grupos catiônicos, suficientes para ligar com alta afinidade uma molécula de 2,3-BPG (modelo bola e bastão; fósforo em laranja), uma molécula com cinco grupos aniônicos em pH fisiológico. Esse arranjo de cargas positivas não existe na Hb oxigenada. Na Hb fetal (HbF), a $His^{142(\beta)}$ é substituída por um resíduo de Ser.

A importância do 2,3-BPG como um efetor alostérico é ressaltada por observações de que sua concentração no eritrócito muda em resposta a várias condições fisiológicas e patológicas. Durante a hipóxia crônica (pO_2 diminuída) secundária a uma doença pulmonar, anemia ou choque, o nível de 2,3-BPG aumenta. Tais aumentos compensatórios também têm sido descritos em fumantes e na adaptação a grandes altitudes. O resultado final é uma maior estabilização do estado T desoxigenado, de baixa afinidade, e um deslocamento adicional da curva de saturação para a direita, facilitando dessa forma a liberação de mais O_2 para os tecidos. Sob a maioria das circunstâncias, o deslocamento à direita tem um efeito insignificante na saturação da Hb pelo O_2 nos pulmões.

TÓPICOS SELECIONADOS

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso capaz de modificar por oxidação (nitração, nitrosação, nitrosilação) de macromoléculas biológicas. Além disso, sua molécula altamente reativa, também conhecida como fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), é sintetizada nas células endoteliais e participa da fisiologia vascular normal, incluindo a vasodilatação (músculo liso), a hemostase (plaquetas) e a expressão de moléculas de adesão (célula endotelial) (quadro da p. 76). Os eritrócitos são os maiores reservatórios intravasculares de NO bioativo e a Hb é indispensável para sua formação, armazenamento e liberação. A SNO-Hb é o produto da *S*-nitrosilação das cadeias laterais da $Cys^{93\beta}$ da Hb. Esses grupos tióis da Cys podem aceitar NO pela transferência a partir da *S*-nitrosoglutationa intracelular ou do NO ligado ao heme (nitrosil-Hb). O NO é liberado pela troca a partir da SNO-Hb para as cadeias laterais de Cys da trocadora de ânion 1, uma proteína da membrana do eritrócito que pode então liberar NO para o plasma. A formação e a quebra da SNO-Hb são sensíveis à pO_2, ao estado de oxigenação/desoxigenação e à transição conformacional estado T/estado R; a SNO-Hb também liga O_2 mais firmemente.

Outro processo notável dentro do eritrócito é a conversão regulada alostericamente do nitrito (NO_2^-) a NO, uma reação realizada pela Hb desoxigenada. Essa atividade intrínseca de "nitrito redutase" se aproveita da concentração moderada de NO_2^- no eritrócito (até 0,3 μmol/L). Embora a química seja complexa, a reação parece gerar um intermediário lábil nitrosil-met(férrica)Hb que pode transferir prontamente NO para a $Cys^{93(\beta)}$ na Hb oxigenada.

DOENÇA AGUDA DA MONTANHA (ALTO DEMAIS, RÁPIDO DEMAIS)

A doença aguda da montanha (AMS, *acute mountain sickness*) se desenvolve em indivíduos que sobem rapidamente as condições ambientais de hipóxia hipobárica. Os sintomas incluem falta de ar, taxa cardíaca rápida, dor de cabeça, náusea, anorexia e distúrbios do sono. Esses sintomas podem se desenvolver em altitudes de 2.000 m (25% de incidência) e a 4.000 m ou mais (50% de incidência). A forma mais severa é o edema cerebral de altitude elevada (2% de incidência), uma condição potencialmente fatal, caracterizada por ataxia e outros problemas neuromusculares e neurológicos. A 4.000 m, a pressão barométrica é 460 mmHg, levando a uma pressão parcial de O_2 ambiental de 96 mmHg (nível do mar, 160). Cálculos fisiológicos geram valores de uma pO_2 traqueal de 86 mmHg (nível do mar, 149), pO_2 alveolar de 50 mmHg (nível do mar, 105) e pO_2 arterial de 45 mmHg (nível do mar, 100). Nessa pressão parcial arterial de O_2, a saturação da Hb é somente de 81% (Fig. 5.4). Consequentemente, a capacidade carreadora de O_2 do sangue arterial diminui a ~160 mL/L (nível do mar, 198). A hipóxia também pode levar a superperfusão dos leitos vasculares, derrame endotelial e edema. Os seres humanos se adaptam a altitudes elevadas (aclimatização) através de vários mecanismos. A hiperventilação é uma resposta de curto prazo crítica que serve para diminuir a pCO_2 alveolar e, por sua vez, aumentar a pO_2 alveolar. O pH arterial também é aumentado durante a hiperventilação, levando a uma maior afinidade da Hb pelo O_2. Aumento gradual no 2,3-BPG tipicamente ocorre em resposta à hipóxia crônica. Outro importante mecanismo adaptativo é a

policitemia, um aumento na concentração de eritrócitos que resulta da estimulação da eritropoietina das células da medula óssea. Dentro de uma semana de aclimatização, a concentração de Hb pode aumentar para valores tão altos quanto 20% para fornecer um conteúdo de O_2 arterial próximo do normal.

Neuroglobina e citoglobina: hemoglobinas secundárias em mamíferos

Duas outras globinas foram recentemente identificadas em humanos. A neuroglobina (Ngb) é expressa primariamente no sistema nervoso central e em alguns tecidos endócrinos; a citoglobina (Cygb) é expressa ubiquamente, primariamente nas células de origem fibroblástica. As concentrações teciduais de ambas são < 1 mmol/L. O polipeptídio Ngb tem 151 resíduos de aminoácidos (16.933 Da), enquanto a Cygb contém 190 resíduos (21.405 Da), com "extensões" de 20 aminoácidos nas extremidades *N*-terminal e *C*-terminal (Fig. 5.1). Ambas as proteínas humanas compartilham somente cerca de 25% de identidade de sequência com a Mb e a Hb. Todos os elementos-chave do empacotamento da globina estão presentes: o sanduíche de α-hélice três sobre três; resíduos de His proximal e distal, e uma bolsa hidrofóbica contendo heme.

Em contraste com a Mg e a Hb, a Ngb e a Cygb contêm hemes hexacoordenados para os estados de valência Fe^{2+} e Fe^{3+}. A HisE7 distal, servindo como o sexto ligante, precisa ser deslocada para permitir a ligação de O_2. Além disso, as afinidades da Ngb e da Cygb são surpreendentemente altas, com valores de P_{50} na faixa de 1-7,5 mmHg e 0,7-1,8 mmHg, respectivamente, comparados com uma P_{50} ≈27 mmHg para a Hb. A ligação de O_2 à Cygb dimérica é cooperativa (coeficiente de Hill, 1,2-1,7), porém independente do pH. Por outro lado, a Ngb monomérica exibe uma afinidade pelo O_2 dependente do pH. As funções dessas globinas secundárias permanecem desconhecidas. A Ngb parece ser comparável à Mb, mediando a liberação de O_2 para a mitocôndria da retina. Tem sido proposto que a Cygb funciona como um cofator enzimático, fornecendo O_2 para a hidroxilação das cadeias laterais de Pro e Lys em algumas proteínas.

ESTUDANTE COM HIPERVENTILAÇÃO, DORMÊNCIA E VERTIGEM

Uma estudante universitária com espasmos musculares severos nos braços, dormência nas extremidades, alguma vertigem e dificuldade respiratória foi levada ao centro de saúde estudantil. A paciente havia se exercitado vigorosamente com o intuito de aliviar o estresse das próximas provas quando repentinamente começou a sentir a respiração rápida e forçada. Suspeitando de hiperventilação, um profissional da área de saúde começou a tranquilizar a estudante e ajudou na sua recuperação fazendo-a respirar em um saco de papel. Após 20 minutos os espasmos cessaram, a sensibilidade voltou aos seus dedos e a vertigem foi resolvida.

Comentário. A hiperventilação alveolar é um padrão de respiração anormalmente rápido, profundo e prolongado que leva à alcalose respiratória, isto é, um decréscimo profundo na pCO_2 e um aumento no pH sanguíneo que se pode atribuir a uma perda aumentada de CO_2 do corpo. Com $[CO_2]$ e $[H^+]$ diminuídas, dois efetores alostéricos da ligação e da liberação de O_2, a afinidade da Hb pelo O_2 aumenta suficientemente para reduzir a eficiência de liberação de O_2 nos tecidos periféricos, incluindo o sistema nervoso central. Outra característica da alcalose é um nível diminuído de cálcio ionizado no plasma, uma situação que contribui para os espasmos e cãibras musculares. Em geral, a hiperventilação é disparada por hipoxemia, doenças cardíacas e pulmonares, desordens metabólicas, agentes farmacológicos e ansiedade.

Variantes normais de hemoglobina

Mais de 95% da Hb encontrada em adultos humanos é HbA, com a composição de subunidades de globina $\alpha_2\beta_2$. A HbA_2 representa 2-3% do total e tem uma composição polipeptídica $\alpha_2\Delta_2$. A HbA_2 está elevada na β-talassemia, uma doença caracterizada por deficiência na biossíntese de β-globina. Funcionalmente, essas duas hemoglobinas de adultos são indistinguíveis. Não surpreendentemente, as mutações no gene que codifica a Δ-globina não apresentam consequência clínica.

Outra Hb secundária é a Hb fetal, HbF; suas subunidades são α-globina e γ-globina. Enquanto ela está presente em não mais do que 1% da Hb de adulto, HbF predomina no feto durante o segundo e o terceiro trimestres da gestação e no neonato. O desligamento do gene no cromossoma 11 causa um decréscimo brusco após o nascimento. A diferença funcional mais notável entre HbF e HbA é sua sensibilidade diminuída ao 2,3-BPG. A comparação da estrutura primária dos polipeptídios β-globina e γ-globina revela a substituição da $His^{143\beta}$ pela Ser na γ-globina (Fig. 5.1). Consequentemente, dois grupos catiônicos que participam da ligação do efetor alostérico aniônico não estão mais disponíveis (Fig. 5.8). Previsivelmente, a interação do 2,3-BPG com a HbF é mais fraca, resultando em uma afinidade aumentada pelo O_2 (P_{50} de 19 mmHg para a HbF comparada com 27 mmHg para a HbA) e em maior estabilização do estado R oxigenado. O benefício direto para essa alteração estrutural e funcional da isoforma HbF é uma transferência mais eficiente de O_2 da HbA materna para a HbF fetal (Fig. 5.4). A separação dessas e de outras variantes de Hb no laboratório clínico é realizada por análises eletroforéticas e cromatográficas (Fig. 5.9).

Doença falciforme, uma hemoglobinopatia comum

A anemia falciforme (AF), uma desordem herdada da estrutura da Hb, é caracterizada por uma tendência dos eritrócitos de se distorcerem e limitarem o fluxo sanguíneo nos leitos capilares. Clinicamente, um indivíduo com AF apresenta episódios intermitentes de anemia hemolítica, resultando na lise crônica das células vermelhas e em crises vaso-oclusivas dolorosas. Características comuns também incluem crescimento diminuído, suscetibilidade a infecções aumentada e danos a vários órgãos. Na população afro-americana, a AF afeta 70-75.000 indivíduos, com frequência de ~0,2%. Os heterozigotos, a maioria assintomática, são 8% nessa mesma população. A anemia falciforme tem uma prevalência de 40% em algumas regiões da África equatorial.

A AF é causada por mutação pontual herdada no gene que codifica a β-globina, levando à expressão da variante HbS da Hb. Na verdade, a HbS tem sido estudada bioquimicamente, biofisicamente e geneticamente por mais de 50 anos, tornando a AF o paradigma de uma doença molecular. A mutação é $Glu^{6(\beta)} \rightarrow Val$: um aminoácido carregado localizado na superfície é substituído por um resíduo hidrofóbico. A valina na subunidade β-globina mutante encaixa-se numa bolsa complementar (algumas vezes chamada de "remendo de aderência") formada na subunidade β-globina de uma molécula de Hb desoxigenada, uma bolsa que se torna exposta somente após a liberação do O_2 nos capilares teciduais.

A HbA permanece como um soluto verdadeiro mesmo em altas concentrações, em grande parte como resultado de uma superfície exterior polar que é compatível e não reativa com as moléculas de Hb vizinhas. Por outro lado, a HbS, quando desoxigenada, é menos solúvel. Ela forma polímeros longos e filamentosos que precipitam facilmente, distorcendo a morfologia do eritrócito para a forma de foice característica. No indivíduo homozigoto com AF (HbS/HbS), o processo complexo de nucleação e polimerização ocorre rapidamente, produzindo cerca de 10% de eritrócitos circulantes em forma de foice. No indivíduo heterozigoto (HbA/HbS, traço falciforme), a cinética de afoiçamento é diminuída por um fator de pelo menos 1.000, explicando a natureza assintomática desse genótipo. Em solução diluída, a HbS apresenta interações com o O_2 (valor de P_{50}, coeficiente de Hill) que são semelhantes àquelas da HbA. Entretanto, o efeito Bohr na HbS concentrada é mais pronunciado, levando a uma maior liberação de O_2 nos capilares e à propensão aumentada para o afoiçamento.

METEMOGLOBINEMIA ADQUIRIDA

Em uma região rural do estado, um bebê de quatro meses foi visto em uma emergência local com episódios de convulsão, dificuldade respiratória e vômitos. A pele do bebê e as membranas mucosas estavam azuladas, indicando cianose. A análise do sangue arterial revelou cor marrom-chocolate, pO_2normal, saturação pelo O_2 de 60% e nível de met-Hb (heme férrico) de 35%. A causa provável da metemoglobinemia tóxica aguda era a água (água de poço) contaminada por concentração de nitrato/nitrito de 34 mg/L. O bebê foi tratado com sucesso pela administração intravenosa de azul de metileno (1-2 mg/kg), que serve para acelerar indiretamente a redução enzimática da met-Hb à Hb normal (ferrosa) pela NADPH met-Hb redutase, a qual, normalmente, é uma via secundária para a

conversão de met-Hb a Hb.

Comentário. A met-Hb é formada quando o ferro ferroso do heme é oxidado a ferro férrico; ele é produzido espontaneamente em uma velocidade baixa e mais rapidamente na presença de certas drogas, nitritos e corantes à base de anilina. Em formas genéticas de metemoglobinemia, a mutação na His proximal ou distal à Tyr torna o ferro do heme mais suscetível à oxidação (Tabela 5.1). O grau de oxidação dos tetrâmeros de Hb pode variar de um grupo heme até os quatro. O eritrócito contém uma NADH-citocromo b_5 redutase, ou NADH diaforase, que é responsável pela maior parte da redução da met-Hb. Os bebês são particularmente vulneráveis à metemoglobinemia porque seus níveis de NADH-citocromo b_5 redutase são a metade daqueles dos adultos. Além disso, seu alto nível de HbF é mais sensível a oxidantes comparado à HbA.



HEMOGLOBINA A_{1c} – UM ESPELHO DA CONDUTA DO DIABETES MELITO

O sangue adulto contém várias subfrações de Hb quimicamente modificadas. Uma delas é a HbA_{1c}, uma Hb glicosilada que está normalmente presente em níveis de 4-6% da fração HbA. A Hb glicosilada é formada *in vivo*pela ligação não enzimática de D-glicose a grupos amino primários dos polipeptídios globina. Reação inicial relativamente rápida e reversível produz uma aldimina lábil (base de Schiff), a qual lentamente se rearranja em uma cetoamina (produto de Amadori). A modificação específica em HbA_{1c} ocorre no resíduo *N*-terminal dos dois polipeptídios de β-globina. O nível de HbA_{1c}aumenta com a concentração média de glicose sanguínea ao longo das últimas 3-6 semanas; ela pode aumentar até 14% ou mais em alguns pacientes com alta glicose sanguínea. As dosagens de HbA_{1c} são usadas rotineiramente para monitorar o controle glicêmico no tratamento de diabetes melito, com objetivo-alvo para a maioria dos pacientes de < 7% de HbA_{1c}. Os métodos quantitativos incluem HPLC, espectrometria de massa e ensaios imunoturbidimétricos. Veja o capítulo 21 para mais discussão.

Os eritrócitos falciformes exibem menor deformabilidade. Eles não se movem mais livremente através da microvasculatura e frequentemente bloqueiam o fluxo sanguíneo, especialmente no baço e nas articulações. Além disso, essas células perdem água, tornam-se frágeis e têm uma duração de vida consideravelmente menor, levando à hemólise e anemia. Exceto durante extremo esforço físico, os indivíduos heterozigotos parecem normais. Por razões ainda não elucidadas, a heterozigosidade está associada a uma resistência aumentada à malária, especificamente ao crescimento do agente infeccioso *Plasmodium falciparum* no eritrócito. Essa observação representa um exemplo de vantagem seletiva que o heterozigoto HbA/HbS exibe sobre o HbA/HbA normal ou sobre o homozigoto HbS/HbS e provavelmente oferece uma explicação para a persistência da HbS no *pool* gênico.



TRATAMENTO ANALGÉSICO DAS CRISES VASO-OCLUSIVAS DA ANEMIA FALCIFORME

A crise vaso-oclusiva aguda é o problema mais comum relatado por pacientes com AF; ela

também é a razão mais frequente de tratamentos de emergência e de admissão hospitalar. Os episódios de dor vaso-oclusiva são imprevisíveis e frequentemente torturantes e incapacitantes. A origem dessa dor progressiva envolve as propriedades reológicas e hematológicas alteradas dos eritrócitos atribuídas à polimerização e agregação da HbS. A disfunção microvascular é precedida por uma resposta inflamatória, indicada pela elevação de proteínas plasmáticas de fase aguda. Por fim, as respostas vasomotoras diminuídas nas arteríolas e as interações adesivas entre os eritrócitos em forma de foice e as células endoteliais nas vênulas pós-capilares restringem o fluxo sanguíneo aos tecidos por todo o corpo.

Os dados epidemiológicos indicam que ~5% dos pacientes com AF podem esperar experimentar 3-10 episódios de dor severa anualmente. Tipicamente, essa crise de dor se resolve entre 5-7 dias, mas uma crise severa pode persistir por semanas. Para proporcionar alívio para o paciente, analgésicos não narcóticos, narcóticos e adjuvantes são usados sozinhos ou em combinação. A severidade e a duração da dor determinam o regime analgésico mais apropriado. Opioides administrados por via parenteral (morfina, hidromorfona, meperidina) são frequentemente usados para o tratamento da dor severa nas crises vaso-oclusivas. Vários estudos recentes sugerem opções adicionais para o paciente e para o médico: a infusão intravenosa contínua de uma droga anti-inflamatória não esteroidal (cetorolaco) e a administração epidural contínua de anestésico local (lidocaína) e analgésico opioide (fentanil) diminuíram efetivamente à dor, que não respondia aos tratamentos convencionais. Além da analgesia, a terapia com oxigênio também foi iniciada.

Outras hemoglobinopatias

Têm sido documentadas mais de 900 mutações em genes que codificam os polipeptídios α- e β-globina. Como ocorre com muitos eventos mutacionais, a maioria delas leva a poucos problemas clínicos. Existe, entretanto, várias centenas de mutações que dão origem a Hb anormais e a fenótipos patológicos. Os mutantes de Hb ou hemoglobinopatias são geralmente denominados a partir do local (hospital, cidade ou região geográfica) no qual a proteína anormal foi primeiramente identificada. Elas são classificadas de acordo com o tipo de alteração estrutural e com a função alterada e as características clínicas resultantes (Tabelas 5.1 e Tabelas 5.2). Enquanto muitas dessas mutações apresentam fenótipos previsíveis, outras são surpreendentemente pleiotrópicas em seus impactos sobre as múltiplas propriedades da molécula de Hb. Com poucas exceções, as variantes de Hb são herdadas como traços recessivos autossômicos. Ocasionalmente, são identificados duplos heterozigotos, por exemplo, HbSC (Fig. 5.9).

Tabela 5.2 Contagem sanguínea completa (CSC). A avaliação laboratorial automatizada do sangue fornece informações inestimáveis para o diagnóstico e o monitoramento de problemas de saúde. A contagem completa, realizada em uma amostra de sangue total, inclui as contagens de células sanguíneas vermelhas (eritrócitos), células brancas (leucócitos) e plaquetas, e indices quantitativos das células vermelhas (MCV, MCH, MCHC e RDW). Os resultados des-crevem o estado hematopoiético da medula óssea e a presença de anemia e sua possivel causa. Os dados apresentados são característicos de um individuo com anemia por deficiência em ferro: baixa HGB, baixo MCV (microcitose) e baixo MCH (hipocromia). Veja também valores de referenda no Apêndice

Contagem sanguinea comp		
Parâmetro	**Paciente**	**Valor de referenda (unidades SI)***
contagem de leucócitos. WBC	6,82 × 10^9/L	4,0-11,0 × 10^9/L
contagem de eritrócitos, RBC	4,78 × 10^{12}/L	4,0-5,2 × 10^{12}/L(F); 4,5-5,9 × 10^{12}/L(M)
hemoglobina, HGB	6,1 mmol/L	7,4-9,9 mmol/L (F); 8,4-10,9 mmol/L (M)
hematócrito, HCT	33,4%	41-46% (F); 37-49% (M)
volume corpuscular médio, MCV	71,9fL	80-96 fL
hemoglobina corpuscular media, MCH	21,3 pg/célula	26-34 pg/célula
concentração de hemoglobina corpuscular media, MCHC	296 g/L	320-360 g/L
amplitude da distribuição de eritrócitos, RDW	17,7%	11,5-14,5%
contagem de plaquetas, PLT	274 × 10^9/L	150-350 × 10^9/L
volume médio de plaquetas, MPV	8,6 fL	6,4-11,0 fL

* M, mulheres; H, homens; ft, 10^{-15} L; pg, 10^{-12} g. Para converter mmol Hb/L para a g Hb/dL, multiplique por 0,01611. Consultetambémos valores dereferência no Apêndice.

SEPARAÇÃO DE HEMOGLOBINAS VARIANTES E MUTANTES; DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINOPATIAS

A mobilidade de uma proteína durante a eletroforese ou a cromatografia é determinada por sua

carga e interação com a matriz. Três técnicas comumente usadas fornecem resolução suficiente para separar variantes de Hb que diferem da HbA em uma única carga: eletroforese, focalização isoelétrica e cromatografia de troca iônica. As separações eletroforéticas e cromatográficas da Hb estão ilustradas na Figura 5.9. O volume de hemolisado necessário (< 100 μL) torna essas técnicas adequadas para amostras de sangue de neonatos e adultos. A quantificação é realizada pela densitometria de varredura ou por espectrometria de absorção. As indicações de anormalidades em testes de triagem são seguidas pela contagem sanguínea completa (Tabela 5.2), analise proteica adicional e análise do DNA para identificar mutações específicas nos genes de globina.



CONTAGEM SANGUÍNEA COMPLETA

A contagem sanguínea completa (CSC) fornece informações sobre as populações celulares sanguíneas e suas características. Os dados são obtidos de amostras de sangue total por meio de análise hematológica automatizada. Alguns instrumentos também fornecem diferencial de leucócitos, contagem de reticulócitos e morfologia de eritrócitos. Resultados típicos para um indivíduo e a variação de referência são mostrados na Tabela 5.2.

Resumo

Este capítulo descreve duas proteínas importantes que interagem reversivelmente com o O_2: a mioglobina (Mb), uma molécula de armazenamento de oxigênio no tecido e a hemoglobina (Hb), uma molécula de transporte de oxigênio no sangue. Ambas utilizam um domínio polipeptídico que contém heme para sequestrar O_2 e aumentar a sua solubilidade. Essas proteínas precisam funcionar eficientemente nos ambientes bioquímicos mais diversos para sustentar o metabolismo aeróbico. Como um tetrâmero de globinas, a Hb é um dos exemplos mais bem caracterizados de cooperatividade nas interações com o ligante. Com sua ampla variedade de moléculas efetoras, a Hb é também um protótipo de proteína alostérica. Mudanças conformacionais nas estruturas terciárias e quaternárias caracterizam a transição entre os estados oxigenados e desoxigenados. As mutações em genes globina levam a um espectro de variantes estruturais e funcionais, dentre as quais estão a Hb fetal e a anemia falciforme.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Discuta por que algumas mutações genéticas na α-globina ou na β-globina resultam em um fenótipo patológico, enquanto a maioria permanece silenciosa ou benigna. Descreva as mutações que são mais difíceis de detectar.

2. Reflita sobre os mecanismos por meio dos quais um adulto com anemia falciforme se beneficiaria com um nível de hemoglobina fetal (HbF) de 20%.

3. Muitos carreadores de oxigênio à base de hemoglobina (HBOCs) têm sensibilidade diminuída ao pH e suscetibilidade à oxidação aumentada. Discuta as consequências de um efeito Bohr reduzido para a liberação de oxigênio na periferia, equilíbrio acidobásico tecidual e transporte de CO_2 para os pulmões.

4. Resuma as observações de animais experimentais nas quais o gene que codifica a mioglobina tenha sido silenciado (*knocked out*).

Leituras sugeridas

Allen BW, Piantadosi CA. How do red blood cells cause hypoxic vasodilation? The SNO-hemoglobin paradigm. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006:H1507-H1512.

Clarke C. Acute mountain sickness: medical problems associated with acute and subacute exposure to hypobaric hypoxia. *Postgrad Med J*. 2006:748-753.

Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest*. 2007:850-858.

Jahr JS, Walker V, Manoochehri K. Blood substitutes as pharmacotherapies in clinical practice. *Curr Opin Anesthesiol*. 2007:325-330.

Juurlink DN, Buckley NA, Stanbrook MB, Isbister GK, Bennett M, McGuigan MA. Hyperbaric oxygen for carbon monoxide poisoning. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. (1):2005. Issue 1.

Ou CN, Rognerud CL. Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC. *Clin Chim Acta*. 2001:187-194.

Pesce A, Bolognesi M, Bocedi A, et al. Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Reports*. 2002:1146-1151.

Schnog JB, Duits AJ, Muskiet FAJ, et al. Sickle cell disease: a general review. *Neth J Med*. 2004:364-374.

Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev*. 2005:585-630.

Sites

Banco de dados de variantes Banco de dados de variantes sobre hemoglobina e talassemias (*links* para sites que descrevem hemoglobinopatias e talassemias humanas). http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/.

The Red Cells and Anemia (apresentação detalhada em cinco partes pelo patologista E. Uthman):

- Blue cells and the CBC. http://web2.airmail.net/uthman/blood_cells.html.
- Anemia: Pathophysiology Consequences, Classification and Clinical Investigation. http://web2.airmail.net/uthman/anemia/anemia.html.
- Nutritional Anemias and Anemia of Chronic Disease. http://web2.airmail.net/uthman/nutritional_anemia/nutritional_anemia.html.
- Hemolytic Anemias. http://web2.airmail.net/uthman/hemolytic_anemia/hemolytic_anemia.html.
- Hemoglobinopathies and Thalassemias. http://web2.airmail.net/uthman/hemoglobinopathy/hemoglobinopathy.html.

Sickle Cell Information Center (site abrangente para pacientes e profissionais). www.scinfo.org.

Animações Animações:

- Exame interativo (formato Jmol) das estruturas da hemoglobina e do heme, ligação ao oxigênio e impacto da mutação da anemia falciforme. Molecular Visualization Resources, University of Massachusetts; http://www.umass.edu/molvis/tutorials/hemoglobin
- Exploração tutorial profunda (formato Jmol) das estruturas da mioglobina e da hemoglobina e ligação ao ligante. © Interactive Concepts in Biochemistry, Science Technologies, John Wiley & Sons Publishers: http://www3.interscience.wiley.com:8100/legacy/college/boyer/0471661791/structure/HbMb/hbmb.htm

Proteínas Catalisadoras — Enzimas

J. Fujii

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever as características das reações enzimáticas do ponto de vista da energia livre, do equilíbrio e da cinética.
- Discutir a estrutura e a composição das enzimas, incluindo o papel dos cofatores e das condições que afetam as reações enzimáticas.
- Descrever a cinética enzimática com base na equação de Michaelis-Menten e no significado da constante de Michaelis (K_m).
- Descrever os elementos da estrutura da enzima que explicam sua especificidade pelo substrato e sua atividade catalítica.
- Descrever os mecanismos reguladores que afetam as reações enzimáticas, inclusive a regulação por efetores alostéricos e por modificação covalente.
- Diferenciar entre os principais tipos de inibição enzimática do ponto de vista da cinética enzimática.
- Discutir o uso terapêutico de inibidores de enzimas e a utilidade dos ensaios enzimáticos clínicos para o diagnóstico.

INTRODUÇÃO

Quase todas as funções biológicas são mantidas por reações químicas catalisadas por catalisadores biológicos, chamados enzimas. Um metabolismo eficiente é controlado por vias metabólicas ordenadas, consecutivas e ramificadas. As enzimas aceleram as reações químicas sob condições fisiológicas, a 37°C e pH neutro. Uma enzima, entretanto, não pode alterar o equilíbrio de uma reação; ela pode somente acelerar a velocidade da reação pela diminuição da energia de ativação necessária (Fig. 6.1). A regulação das atividades das enzimas permite adaptação do metabolismo a condições que mudam rapidamente. Quase todas as enzimas são proteínas, mas algumas moléculas de ácidos ribonucleicos, denominadas ribozimas, têm também atividade catalítica (Cap. 32). Com base na análise do genoma humano, estima-se que cerca de um quarto dos genes humanos codifique enzimas que catalisam reações metabólicas.

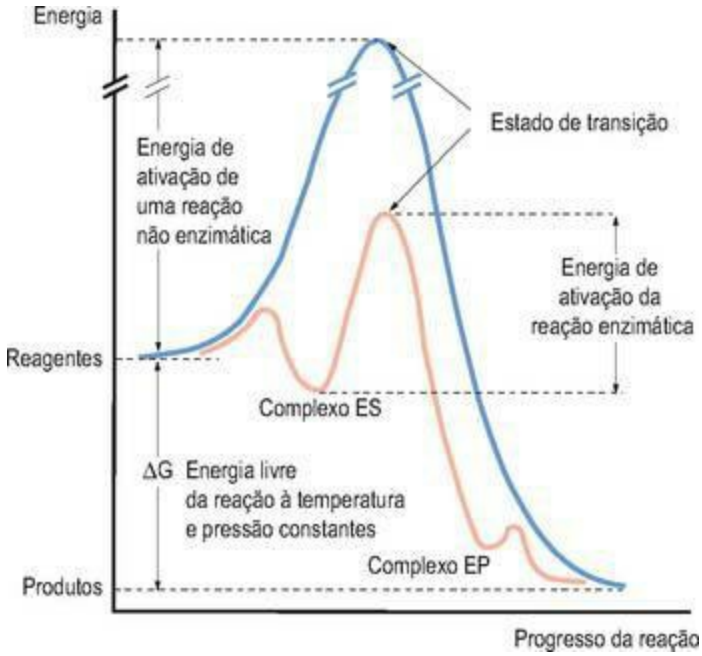


Fig. 6.1 Perfil das reações enzimáticas e não enzimáticas. Os princípios básicos de uma reação catalisada por enzimas são os mesmos que os de quaisquer outras reações quíicas. Quando uma reação química acontece, o substrato deve ganhar energia de ativação para atingir um ponto chamado de estado de transição da reação, no qual o nível de energia é máximo. Uma vez que o estado de transição de uma reação catalisada por enzima tem um nível mais baixo de energia que o da reação não catalisada, a reação da enzima ocorre mais rapidamente. Complexo ES, complexo enzima substrato; complexo EP, complexo enzima-produto.

REAÇÃES ENZIMÁTICAS

Fatores que afetam as reações enzimáticas

Efeito da temperatura

No caso de um catalisador inorgânico, a velocidade da reação aumenta com a temperatura do sistema, e a elevação da temperatura pode ser usada para acelerar a reação. Enzimas, por outro lado, funcionam normalmente como catalisadoras à temperatura (do ambiente ou do corpo) constante. Em ensaios *in vitro*, entretanto, a atividade de uma enzima aumenta com a temperatura, mas declina depois em temperaturas mais elevadas. Assim sendo, as enzimas mostram *in vitro* um ótimo de temperatura. Isso acontece porque elas, como todas as proteínas, desnaturam em altas temperaturas e perdem atividade.

Efeito do pH

Cada enzima tem um ótimo de pH porque aminoácidos ionizáveis, tais como histidina, glutamato e cisteína, participam das reações catalíticas. Enzimas citosólicas têm ótimos de pH na faixa de 7–8. A pepsina, que é secretada pelas células gástricas e funciona no suco gástrico, tem um ótimo de pH de 1,5–2,0; a tripsina e a quimotripsina têm um pH ótimo alcalino, coerente com sua atividade digestiva no suco pancreático alcalino; enzimas lisossomais têm pH ótimo tipicamente ácido. A sensibilidade das enzimas ao pH resulta do efeito do pH sobre a carga iônica das cadeias laterais dos aminoácidos das enzimas. Vários solutos, incluindo substratos, produtos, íons metálicos e moléculas reguladoras também afetam a velocidade das reações enzimáticas.

Definição de atividade enzimática

Para efeito de padronização, a atividade de uma enzima é medida sob condições definidas (temperatura, pH, tampão, concentrações de substrato e de coenzima). A velocidade (v) de uma reação enzimática sob essas condições é definida como a velocidade de conversão do substrato em produto por unidade de tempo. Uma unidade de enzima é uma medida da quantidade da enzima presente. A unidade internacional comumente usada (UI) para uma enzima é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um micromol de substrato em produto por min (1 UI = 1 μmol/min). O *katal* é uma unidade internacional para a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 mol do substrato em 1 mol de produto por segundo (1 kat = 1 mol/s). Devido ao katal ser um número geralmente muito pequeno, a unidade internacional, muito maior, é mais comumente usada como a unidade padrão de atividade.

A atividade específica de uma enzima, uma medida da atividade por quantidade de proteína, é expressa como μmol/min/mg de proteína ou por UI/mg de proteína. As atividades específicas das enzimas variam largamente entre os tecidos, dependendo da função metabólica do tecido. As enzimas para a síntese do colesterol, por exemplo, têm uma atividade específica mais alta (UI/mg de tecido) no fígado do que no músculo, o que é coerente com o papel do fígado na biossíntese do colesterol. A atividade específica de uma enzima é útil para estimar a sua pureza — quanto maior a atividade específica de uma enzima, maior sua pureza e homogeneidade.

A especificidade de reação e a especificidade para o substrato são determinadas pela estrutura do sítio ativo

A maioria das enzimas é altamente específica, tanto para o tipo de reação que catalisam como para a natureza do(s) substrato(s). A especificidade de reação, ou seja, a reação que a enzima catalisa, é quimicamente determinada pelos resíduos de aminoácidos presentes no centro catalítico da enzima. Em geral, o sítio ativo de uma enzima é composto pelo sítio de ligação do substrato e pelo sítio catalítico. A especificidade do substrato é determinada pelo tamanho, estrutura, cargas, polaridade e caráter hidrofóbico do sítio de ligação do substrato. Isso decorre de o substrato ter de se ligar no sítio ativo na primeira etapa da reação, o que estabelece o palco para que ocorra a catálise. Enzimas altamente específicas como a catalase, que degrada a H_2O_2, e a urease, que degrada a ureia, só catalisam uma única reação química, mas algumas enzimas têm especificidade mais ampla. As serinaproteases são um exemplo típico de tal grupo. Elas são uma família de enzimas estreitamente relacionadas, tais como as enzimas pancreáticas, a quimotripsina, a tripsina e a elastase, todas com um resíduo reativo de serina no sítio catalítico. Elas catalisam a hidrólise de ligações peptídicas no lado carboxila de um número limitado de aminoácidos em proteínas. Mesmo que elas apresentem estruturas e mecanismos catalíticos similares, as especificidades para seus substratos são muito diferentes por causa das características estruturais dos seus sítios de ligação (Fig. 6.2).

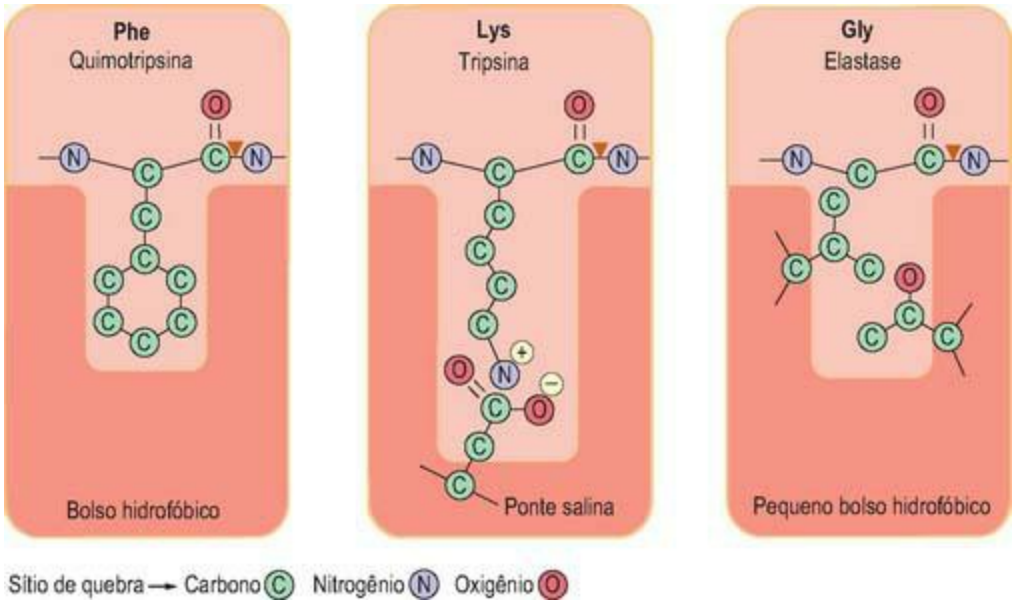


Fig. 6.2 Características dos sítios de ligação do substrato nas serinaproteases quimotripsina, tripsina e elastase. Na quimotripsina um bolso hidrofóbico liga resíduos de aminoácidos aromáticos, tais como fenilalanina (Phe). Na tripsina, a carga negativa do resíduo aspartato no sítio de ligação do substrato promove a quebra no lado carboxila dos resíduos de lisina (Lys) e da arginina (Arg) positivamente carregados. Na elastase, as cadeias laterais de uma valina e de uma treonina bloqueiam o sítio de ligação do substrato e permitem a ligação de aminoácidos com cadeias laterais pequenas ou sem cadeias laterais, tais como a glicina (Gly).

Isozimas são enzimas que catalisam a mesma reação, mas que diferem na sua estrutura primária e/ou na composição de suas subunidades. Níveis de algumas enzimas tecido-específicas e isozimas são medidos no soro para estabelecer diagnósticos (Fig. 6.3 e Tabela 6.1).

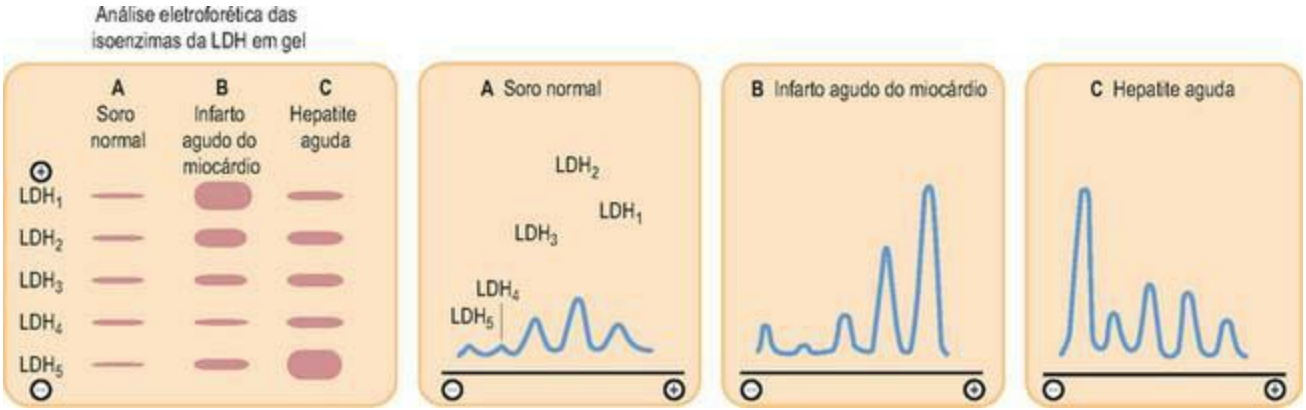


Fig. 6.3 Padrões densitométricos das isoenzimas de LDH em soro de pacientes diagnosticados com infarto do miocárdio ou hepatite aguda. Isoenzimas, diferindo ligeiramente na carga, são separadas por eletroforese em acetato de celulose, visualizadas usando um substrato cromogênico e quantificadas por densitometria. A atividade total de LDH no soro também está aumentada nesses pacientes. Como a hemólise libera LDH dos eritrócitos e afeta o diagnóstico, as amostras de sangue devem ser tratadas com cuidado. As medidas de LDH para o diagnóstico do infarto do miocárdio foram recentemente substituídas pela medida dos níveis de troponina no plasma.

Tabela 6.1 Algumas enzimas usadas no diagnóstico clfnico de doenças.

Algumas enzimas usadas no diagnóstico clínico de doenças		
Enzima	**Fontes teciduais**	**Uso diagnóstico**
AST	coração, músculo esquelético, fígado, cérebro	doença do fígado
ALT	fígado	doença do fígado, p. ex., hepatite (ALT > AST)
Amilase	pancreas, glândula salivar	pancreatite aguda, obstrução biliar
CK	músculo esquelético, coração, cérebro	distrofia muscular, infartodo miocárdio
GGT	fígado	hepatite, cirrose
LDH	coração, eritrócitos do fígado	linfoma, hepatite

lipase	pancreas	pancreatite aguda, obstrução biliar
fosfatase alcalina	osteoblastos	doenças dos ossos, tumores ósseos
fosfatase ácida	próstata	cancer da próstata

AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase;

CK, creatina fosfoquinase; GGT, glutamiltransferase;

LDH, lactato desidrogenase.

Nomenclatura das enzimas

Uma classificação sistemática é necessária para organizar as diferentes enzimas que catalisam os muitos milhares de reações que acontecem no nosso corpo. A cada enzima é atribuído um número de classificação (EC) de quatro dígitos. O primeiro dígito identifica a enzima como membro de uma das seis principais classes de enzimas mostradas na Tabela 6.2. Os dois dígitos seguintes indicam as subclasses e as subsubclasses dos substratos; o quarto dígito indica o número de série específico da enzima. A transferência de equivalentes de redução de um sistema redox para outro é catalisada pelas oxidorredutases (Classe 1). A transferência de outros grupos funcionais de um substrato para outro é catalisada pelas transferases (Classe 2). As hidrolases (Classe 3) catalisam transferência de grupo, mas a molécula aceptora é unicamente a molécula da água. Reações de adição ou remoção de H_2O, NH_3 ou CO_2 são catalisadas por liases (Classe 4), também chamadas sintases. Isomerases (Classe 5) catalisam reações de isomerização pelo rearranjo de átomos dentro de uma mesma molécula, não afetando assim a composição atômica do substrato. Ligases, também chamadas sintetases (Classe 6), usam ATP para catalisar reações de síntese dependentes de energia. Em geral, as enzimas são citadas pelos seus nomes comuns, tal como ribonuclease pancreática bovina, mas designações EC são essenciais para alguns propósitos, como, por exemplo, para pesquisar informações em bancos de dados de proteínas (Cap. 2) e para pesquisa sobre relações estrutura-função.

Tabela 6.2 Classificação de enzimas. Principals classes de enzimas.

Classificação de enzimas		
Classe	**Reação**	**Enzimas**
1. Oxidorredutases	$A_{red} + B_{OX} \rightarrow A_{OX} + B_{red}$	desidrogenases, peroxidases
2. Transferases	A—B + C → A + B—C	hexoquinase, transaminases
3. Hidrolases	A—B + H_2O→ A—H + B—OH	fosfatase alcalina, tripsina
4. Liases (sintases)	A (XH)—B→ A—X + B—H	anidrase carbônica, desidratases
5. Isomerases	A ISO—A	triose fosfato isomerase, fosfoglicomutase
6. Ligases (sintetases)	A + B + ATP→ A—B + ADP + Pi	piruvato carboxilase, DNA ligases



ESPECIFICIDADE TEDICUAL DAS ISOZIMAS DE LACTATO DESIDROGENASES

Uma mulher de 56 anos de idade foi admitida em unidade de tratamento intensivo. A paciente havia sofrido de febre baixa por uma semana, tinha alguma dor no peito e dificuldade para respirar há 24 horas. Nenhuma anormalidade foi encontrada no raio X do tórax ou no eletrocardiograma. No entanto, um teste sanguíneo mostrou contagem de leucócitos de 12.100/mm^3 (normal: 4.000-

9.000/mm^3), de eritrócitos de 240 × 10^4/mm^3, de hemoglobina de 8,6 g/dL, de lactato desidrogenase (LDH) de 1.400 UI/L (normal: 200-400 UI/L). Os níveis de outras enzimas estavam normais. Tomando por base os testes sanguíneos, o perfil das isozimas LDH e outros dados, a paciente foi finalmente diagnosticada com linfoma maligno.

Comentário. LDH é uma enzima tetramérica, composta de duas subunidades diferentes de 35 kDa. O coração contém o tipo H, os músculos esqueléticos e o fígado apresentam a subunidade do tipo M, que são codificadas por genes diferentes. Cinco tipos de isozimas tetraméricas podem ser formados a partir dessas subunidades: H_4 (LDH_1), H_3M_1 (LDH_2), H_2M_2 (LDH_3), H_1M_3 (LDH_4) e M_4 (LDH_5). Já que a distribuição de isozimas é diferente de tecido para tecido, é possível diagnosticar dano tecidual pelo ensaio da atividade total de LDH e, depois, pelo perfil das suas isozimas (Fig. 6.3).

Papel das coenzimas

Moléculas ajudantes, chamadas de coenzimas, desempenham uma parte essencial em reações catalisadas por enzimas. Enzimas ligadas a coenzimas covalentemente ou não covalentemente são chamadas de holoenzimas. Uma holoenzima sem uma coenzima é denominada apoenzima. Coenzimas são divididas em duas categorias. Coenzimas solúveis ligam-se de modo reversível à porção proteína da enzima. Coenzimas são, frequentemente, modificadas durante a reação enzimática, depois dissociam-se da enzima e são regeneradas por outra enzima; as oxidorredutases, apresentadas no capítulo 9, têm coenzimas que podem ser oxidadas por uma enzima e então reduzidas e recicladas por outra. Coenzimas, tais como a coenzima A, ajudam no transporte de intermediários de uma enzima para a outra em uma sequência de reações. A maioria das coenzimas é derivada de vitaminas. Por exemplo, os derivados do grupo das vitaminas B, niacina e riboflavina, agem como coenzimas em reações de oxidorredutases. A estrutura e a função das coenzimas serão descritas em capítulos seguintes. Grupos prostéticos são ligados à s enzimas de modo firme, frequentemente por ligações covalentes, e permanecem ligados durante todo o ciclo catalítico. Algumas enzimas requerem para a sua atividade íons (metais) inorgânicos, frequentemente denominados cofatores. Por exemplo, as enzimas da coagulação sanguínea necessitam de Ca^{2+}, e as oxidorredutases usam ferro, cobre e manganês.

PROPORÇÃO DOS GENES PARA ENZIMAS NO GENOMA HUMANO INTEIRO

Cerca de um quarto dos genes codifica enzimas. Nomes de grupos de enzimas com número e proporção (porcentagem entre parênteses) de um total de 26.383 genes foram os seguintes: transferases, 610 (2,0); sintases e sintetases, 313 (1,0); oxidorredutases, 656 (2,1); liases, 117 (0,4); ligases, 56 (0,2); isomerases, 163 (0,5); hidrolases, 1.227 (4,0); quinases, 868 (2,8); enzimas dos ácidos nucleicos, 2.308 (7,5). Os dados originais (Venter *et al., Science* 2001; **291**:1335) são os citados aqui e, por isso, a classificação não combina exatamente com a nomenclatura da Tabela 6.2.

ISOZIMAS

Os perfis de isozimas são realizados frequentemente em laboratório clínico para diagnosticar doenças (Fig. 6.3) A definição de isozimas é frequentemente operacional, isto é, está baseada em métodos de ensaio simples e reprodutíveis que, por vezes, não requerem análise precisa da estrutura da enzima. O termo isozima é usado comumente para nos referirmos a: (1) variantes genéticas de uma enzima; (2) proteínas geneticamente independentes com pouca homologia; (3) heteropolímeros de duas ou mais cadeias polipeptídicas ligadas não covalentemente; (4) enzimas não relacionadas que catalisam reações similares, como as enzimas que conjugam-se a diferentes grupos prostéticos ou que requerem diferentes coenzimas ou cofatores; (5) formas diferentes de uma única cadeia polipeptídica que podem mostrar, por exemplo, variações na composição de carboidratos, na desaminação de aminoácidos ou numa modificação proteolítica.

CINÉTICA ENZIMÁTICA

A equação de Michaelis-Menten: um modelo simples de reação enzimática

As reações enzimáticas são por natureza reações de múltiplas etapas que ocorrem por muitas reações parciais. Em 1913, muito antes que a estrutura das proteínas fosse conhecida, Michaelis e Menten desenvolveram um modelo simples para examinar a cinética das reações catalisadas por enzimas (Fig. 6.4). O modelo de Michaelis-Menten tem por base que o substrato S se liga à enzima E, formando um intermediário obrigatório, o complexo enzima-substrato (ES), em que ocorrem, então, reações na superfície da molécula da enzima e, a seguir, decompõe-se em E + produto (P). O modelo assume que E, S e ES entram em equilíbrio rápido uns com os outros, tal que uma concentração de equilíbrio dinâmico de ES é rapidamente alcançada e a decomposição do complexo ES em E + P é a etapa limitante da catálise.

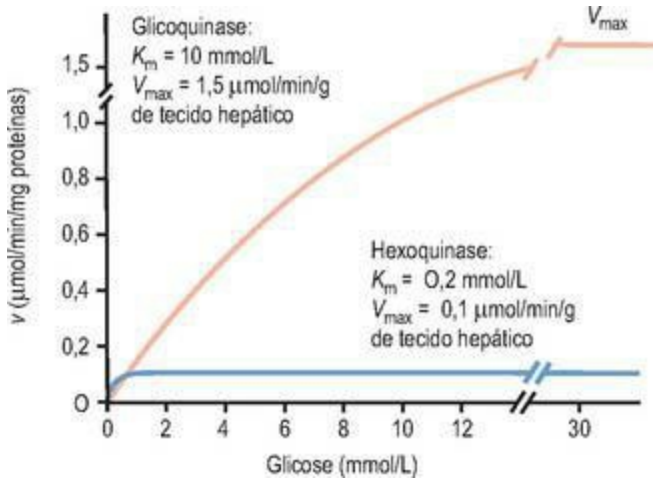


Fig. 6.4 Propriedades da glicoquinase e da hexoquinase. A glicoquinase e a hexoquinase catalisam a mesma reação, a fosforilação da glicose a glicose-6-fosfato (Glc-6-P). Elas mostram-se com diferentes propriedades cinéticas, têm distribuições teciduais diferentes e funções fisiológicas diferentes.

A constante catalítica, k_{cat}, também conhecida por número de modificações ou *turnover*, é a constante de velocidade que descreve quão rapidamente uma enzima catalisa uma reação. A k_{cat} é definida como o número de moléculas do substrato que podem ser transformadas por uma molécula de enzima por unidade de tempo. A proporção de ES em relação ao número total de moléculas de enzimas $[E]_t$, isto é, a razão $[ES]/[E]_t$, limita a velocidade de uma reação catalisada por enzima (v) tal que:

$$v = k_{cat}[ES]$$

Desde que E, S e ES estejam em equilíbrio químico, a enzima atingirá a velocidade máxima, V_{max}, em concentrações altíssimas (saturantes) de substrato [S] quando $[ES] \approx [E]_t$. Assim:

$$V_{max} = k_{cat}[E]_t$$

Para a dissociação do complexo ES, a lei de ação das massas produz:

$$K_d = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Dado que:

$$[E]_t = [E] + [ES]$$

$$\frac{[ES]}{[E]_t} = \frac{[S]}{(K_m + [S])}, \text{em que } K_m = K_d$$

Consequentemente, v é dada por:

$$v = \frac{(k_{cat}[E]_t[S])}{(k_m + [S])}$$

Desde que k_{cat} $[E]_t$ corresponde à velocidade máxima, V_{msx}, que é atingida em altas concentrações (saturantes) de substrato, obtém-se a equação de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{(V_{max}[S])}{(K_m + [S])}$$

A análise dessas equações indica que a constante de Michaelis, K_m, é expressa em unidades de concentração e corresponde à concentração de substrato na qual ν é 50% da velocidade máxima, isto é, $[ES] = ½ [E]_t$ e $v = V_{max}/2$.

O modelo de Michaelis-Menten está baseado nos pressupostos:

- E, S e ES estão em equilíbrio rápido
- Não há formas de enzima presentes que não sejam E e ES
- A conversão de ES em E + P é a etapa irreversível, limitante de velocidade. Mesmo que todas as reações catalisadas por enzimas sejam teoricamente reversíveis, as velocidades iniciais são as normalmente medidas, isto é, quando a concentração de produtos e a reação reversa são desprezíveis.

Tipos de modelos cinéticos similares foram desenvolvidos para descrever a cinética de enzimas com mais de um substrato e mais de um produto (cinética multissubstrato e multiproduto).

ISOZIMAS: GLICOQUINASE E HEXOQUINASE

A hexoquinase catalisa a primeira etapa do metabolismo da glicose em todas as células, que é a reação de fosforilação da glicose pelo trifosfato de adenosina (ATP) para formar glicose 6-fosfato (Glc-6-P):

Glicose + ATP → glicose-6-fosfato + ADP

Essa enzima tem uma K_m baixa para glicose (0,2 mmol/L) e sofre inibição alostérica pelo produto, a Glc-6-P. Uma vez que os níveis normais de glicose no sangue estão em torno de 5 mmol/L e os níveis intracelulares ao redor de 0,2-2 mmol/L, a hexoquinase catalisa eficientemente essa reação (50-90% da V_{max}) sob condições normais, por exemplo, no músculo.

Os hepatócitos, que estocam glicose sob a forma de glicogênio, e as células β do pâncreas, que regulam, por secretarem insulina, o consumo de glicose nos tecidos e seu armazenamento no fígado, contêm uma isozima chamada glicoquinase. A glicoquinase catalisa a mesma reação que a hexoquinase, mas tem uma K_m muito maior para a glicose (10 mmol/L) e não é inibida pelo produto, Glc-6-P. Como a glicoquinase tem uma K_m maior que a hexoquinase, a glicoquinase fosforila a glicose com eficiência crescente à medida que os níveis de glicose do sangue aumentam depois de uma refeição (Fig. 6.4). Um dos papéis fisiológicos da glicoquinase no fígado é fornecer Glc-6-P para a síntese de glicogênio, uma forma de reserva de glicose. Nas células β do pâncreas, a glicoquinase funciona como um sensor de glicose, determinando o limiar para a secreção de insulina. Camundongos carentes de glicoquinase nas células β do pâncreas morrem de profunda hiperglicemia após três dias de nascidos, devido a uma falha na secreção de insulina (Cap. 21).

O uso dos gráficos de Lineweaver-Burk e Eadie-Hofstee para estimar K_m e V_{max}

Em um gráfico da velocidade de reação *versus* a concentração de substrato, a velocidade da reação se aproxima da velocidade máxima (V_{max}) de modo assintótico (Fig. 6.5A), por isso torna-se difícil obter por simples extrapolação valores precisos para a V_{max} e, consequentemente, para a K_m (concentração de substrato necessária para metade da velocidade máxima). Para resolver esse problema, algumas transformações lineares da equação de Michaelis-Menten foram desenvolvidas.

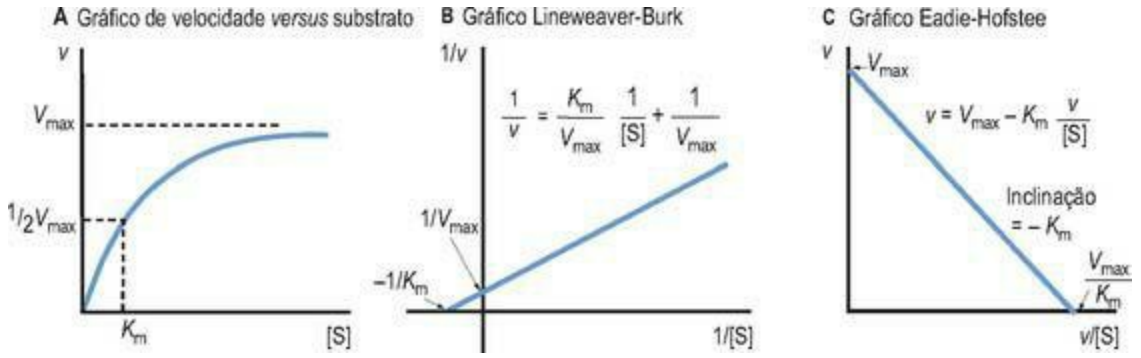


Fig. 6.5 Gráficos de cinética enzimática. Representações cinéticas das propriedades das enzimas. (A) Gráfico Michaelis-Menten de velocidade (v)*versus* concentração de substrato ([S]). (B) Gráfico Lineweaver-Burk. (C) Gráfico Eadie-Hofstee.

Gráfico Lineweaver-Burk

O gráfico Lineweaver-Burk, ou duplo recíproco, é obtido tomando-se o inverso da equação do estado estacionário de Michaelis-Menten (Fig. 6.5B). Pelo rearranjo da equação, obtemos:

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{1}{V_{max}}\right) + \left\{\left(\frac{k_m}{V_{max}}\right)\left(\frac{1}{[S]}\right)\right\}$$

Essa equação produz uma reta (y = mx + b), sendo y = 1/v, x = 1/[S], m = inclinação e b = interseção em y. Assim sendo, um gráfico de 1/v *versus* 1/[S] (Fig. 6.5B) tem uma inclinação de K_m/V_{max}, uma interseção no eixo 1/v igual a $1/V_{max}$ e uma interseção no eixo 1/[S] igual a $-1/K_m$. Mesmo que o gráfico Lineweaver-Burk seja muito usado para análises cinéticas, devido ao fato de que são usados os inversos, um erro experimental pequeno pode resultar em um grande erro nos valores da K_m e da V_{max} graficamente determinados. Outra desvantagem é que dados importantes obtidos em altas concentrações de substrato terão seus inversos aglomerados dentro de uma estreita faixa próxima ao eixo 1/v.

MEDIDAS DE ATIVIDADE DE ENZIMAS EM AMOSTRAS CLÍNICAS

Nos laboratórios clínicos, a atividade enzimática é medida na presença de concentrações saturantes de substrato(s) e coenzimas. As velocidades iniciais são anotadas para minimizar os erros

que resultam da reação reversa. Sob essas condições, $v \approx V_{max}$ e a atividade é diretamente proporcional à concentração de enzima. A quantidade de enzima (atividade enzimática) é comumente expressa como UI/mL de plasma, soro ou líquido cerebroespinhal, em vez de por mg de proteínas. Para comparações entre laboratórios, as condições para os ensaios devem ser obrigatoriamente padronizadas, por exemplo, pela especificação das concentrações de substrato e coenzima usadas, das substâncias do tampão, da concentração do tampão, das espécies iônicas, da força iônica, do pH e da temperatura. A maioria das amostras clínicas é coletada sob jejum, o que assegura medidas consistentes dos constituintes cujas concentrações podem variar diuturnamente e de outros, como glicose e lipídios, que podem se alterar em resposta à ingestão de alimentos. Amostras ricas em lipídios (lipidêmicas) mostram-se turvas e podem produzir dados não confiáveis por métodos espectrofotométricos e fluorométricos. Para evitar esses problemas, as amostras clínicas devem ser deslipidadas, frequentemente por extração com solvente orgânico.

Gráfico Eadie-Hofstee

Um segundo gráfico de forma linear da equação de Michaelis-Menten, amplamente usado, é o gráfico Eadie-Hofstee (Fig. 6.5C). Ele é descrito pela equação:

$$v = V_{max} - \left(K_m \times \frac{v}{[S]}\right)$$

Nesse caso, um gráfico de v *versus* v/[S] tem no eixo *y* (interseção de v) o valor da V_{max}, uma interseção no eixo *x* (v/[S]) de V_{max}/K_m e uma inclinação de $-K_m$. O gráfico Eadie-Hofstee não aglomera os valores das concentrações elevadas de substrato.

MECANISMOS DE AÇÃO DAS ENZIMAS

As enzimas apresentam mecanismos de ação muito variados. Em alguns casos, a catálise se efetua sobre o substrato ligado sem interação covalente estável entre enzima e substrato. Em outros casos, um intermediário covalente é formado na superfície da enzima e depois liberado da enzima. Pode acontecer que toda a ação se dê sobre uma coenzima que forma uma ligação covalente com o substrato. Os mecanismos de ação de muitas enzimas serão discutidos em capítulos posteriores.

As serinaproteases, apresentadas na Figura 6.2, representam bem aquelas enzimas que formam um intermediário covalente com seus substratos. Essas enzimas clivam as ligações peptídicas nas proteínas e, como em todas as reações enzimáticas, grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos participam da catálise. Na família das serinaproteases, uma serina do sítio ativo catalisa a clivagem da ligação peptídica. O grupo funcional da serina, um álcool primário, não está entre os grupos funcionais mais reativos da química orgânica. Para aumentar sua atividade nas serinaproteases, esse resíduo de serina faz parte de uma "tríade catalítica", no caso da quimotripsina: Asp^{102}, His^{57} e Ser^{195} (Fig. 6.6). Interações de ligações de hidrogênio em concerto entre esses aminoácidos aumentam a característica nucleofílica da serina, tal que ela pode atacar o átomo de carbono da carbonila da ligação peptídica do substrato. A quimotripsina é específica para clivar no lado carboxila das ligações peptídicas de que participam aminoácidos aromáticos, tais como a fenilalanina. Esse mecanismo de reação enzimático está esboçado na Figura 6.7, que mostra a formação e a clivagem de um intermediário ligado à enzima.

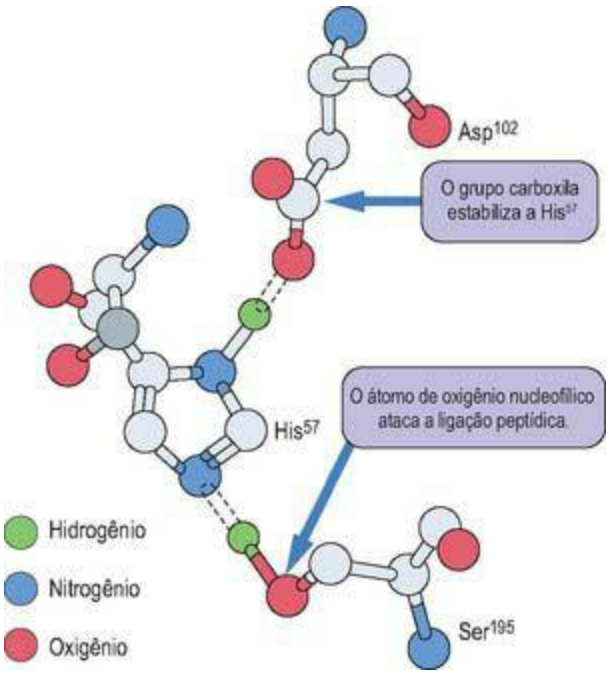


Fig. 6.6 Modelo esquemático de uma tríade catalítica de serinaprotease.

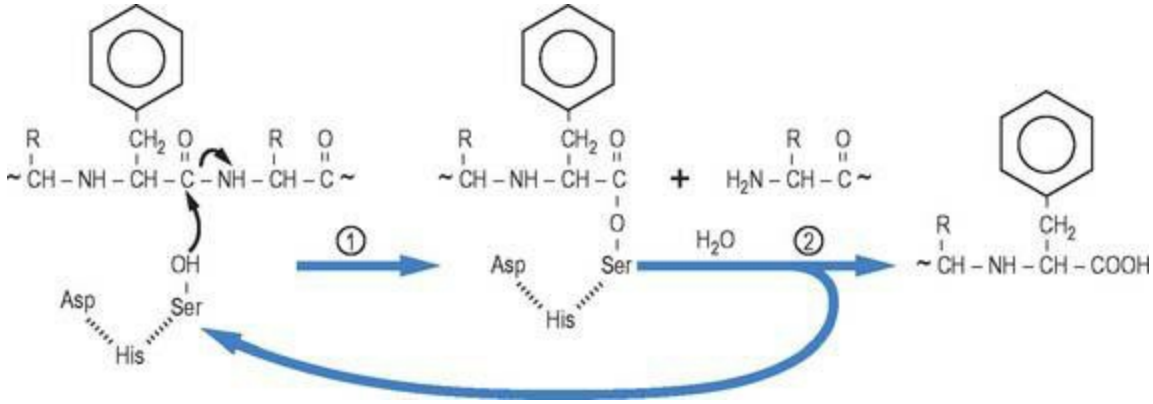


Fig. 6.7 Mecanismo de ação da quimotripsina. O resíduo de serina do sítio ativo ataca o grupo carbonila da ligação peptídica no lado carboxila de um resíduo de fenilalanina. O peptídio carboxi-terminal é liberado e o peptídio amino-terminal fica como um intermediário ligado à enzima — o peptídio amino-terminal ligado à carboxila da fenilalanina esterificando o resíduo de serina do sítio ativo. A ligação éster é hidrolisada numa segunda etapa da reação para liberar o peptídio amino-terminal e recompor a enzima ativa.

Tripsina e elastase, outras duas enzimas digestivas com especificidades para aminoácidos diferentes, são similares à quimotripsina em muitos aspectos. Cerca de 40% das sequências dessas três enzimas são idênticas, e suas estruturas tridimensionais são muito similares. As três enzimas contêm a tríade catalítica aspartato-histidina-serina e são inativadas por reação de fluorofosfatos com a serina do sítio ativo. O gás dos nervos, di-isopropilfluorofosfato, forma um éster serinadi-isopropilfluorofosfato estericamente impedido que é lentamente hidrolisado.

INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Enzimas podem ser inibidas por processos diferentes

Entre as numerosas substâncias que afetam os processos metabólicos, os inibidores enzimáticos são particularmente importantes. Muitas drogas, sejam as de ocorrência natural, sejam as sintéticas, agem como inibidores enzimáticos. Os metabólitos desses compostos podem também inibir a atividade enzimática. A maioria dos inibidores age de modo reversível, mas existem também os inibidores irreversíveis, que modificam permanentemente a enzima em que se ligam. Pelo uso de gráficos Lineweaver-Burk é possível distinguir três tipos de inibição reversível: competitiva, acompetitiva e não competitiva.

Inibidores competitivos causam um aumento aparente da K_m sem alteração da V_{max}

Uma enzima pode ser inibida competitivamente por substâncias cuja estrutura química seja semelhante à quela do substrato. Esses compostos ligam-se ao sítio ativo e competem com o substrato por esse sítio ativo: eles causam um aumento aparente na K_m, mas nenhuma mudança na V_{max} (Fig. 6.8). A inibição não é resultado de um efeito sobre a atividade enzimática, mas sobre o acesso do substrato ao centro ativo. O esquema reacional para a inibição competitiva é:

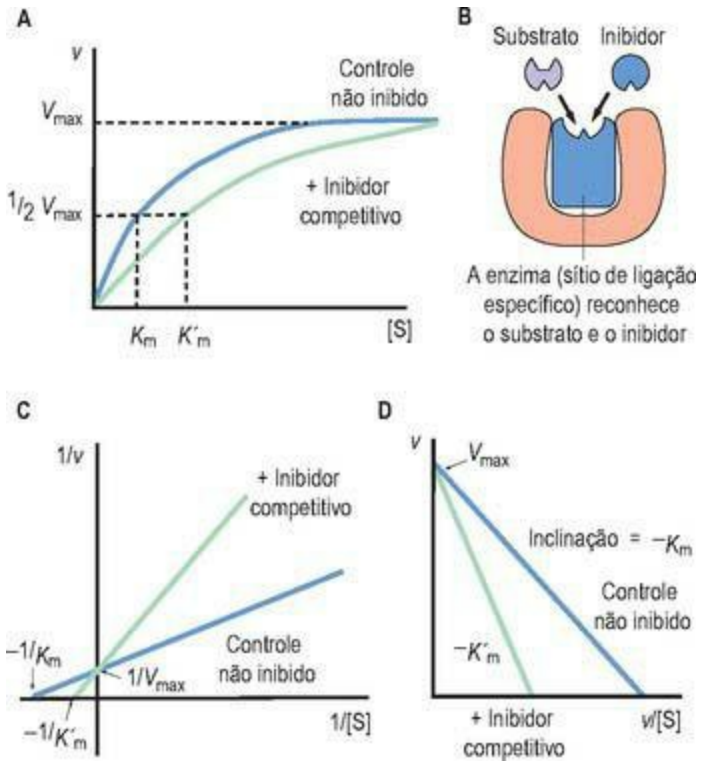


Fig. 6.8 Inibição enzimática competitiva. (A) Gráfico de velocidade*versus* concentração de substrato. (B) Mecanismo da inibição competitiva. (C) Gráfico Lineweaver-Burk na presença de um inibidor competitivo. (D) Gráfico Eadie-Hofstee na presença de um inibidor competitivo.K'_m é aK_m aparente na presença do inibidor.

$$\begin{matrix} E \\ + \\ I \end{matrix} \overset{+S}{\underset{+I}{\rightleftharpoons}} \begin{matrix} ES \\ \rightleftharpoons \\ EI \end{matrix} \rightarrow E + P$$

A constante de inibição (K_i) é a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (EI) e, quanto menor for o valor de K_i, mais eficiente será a inibição da atividade enzimática. A despeito do valor da K_i, entretanto, a velocidade de uma reação catalisada por enzima na presença de inibidor competitivo pode ser aumentada pelo aumento da concentração do substrato, já que o substrato, em altas concentrações, compete mais efetivamente com o inibidor.

TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO COM UM INIBIDOR DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA (ECA)

Um homem de 50 anos de idade foi internado em um hospital sofrendo de fadiga generalizada, rigidez no ombro e dor de cabeça. O paciente media 1,80 m e pesava 84 kg. Sua pressão sanguínea era de 196/98 mmHg (normal abaixo de 140/90 mmHg, sendo a ideal abaixo de 120/80 mmHg) e a sua pulsação era de 74. Foi diagnosticado como hipertenso. O paciente foi medicado com captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA). Depois de tratamento por cinco dias, sua pressão sanguínea retornou para níveis próximos do normal.

Comentário. A renina nos rins converte o angiotensinogênio em angiotensina I, que é então proteoliticamente clivada para produzir angiotensina II pela ECA. A angiotensina II aumenta a retenção de fluidos e eletrólitos pelos rins, o que contribui para a hipertensão. Dessa forma, a inibição da ECA é um importante alvo para o tratamento da hipertensão. O captopril inibe a ECA competitivamente, diminuindo a pressão sanguínea (Cap. 23).

O ENVENENAMENTO POR METANOL PODE SER TRATADO COM ADMINISTRAÇÃO DE ETANOL

Um homem de 46 anos de idade deu entrada na emergência sete horas depois de consumir grande quantidade de bebida alcoólica falsificada. Ele não enxergava claramente e reclamava de dores no abdome e nas costas. Os resultados do laboratório indicaram acidose metabólica severa e osmolalidade sérica de 465 mmol/kg (faixa de referência de 285-295 mmol/kg) e nível de metanol no soro de 4,93 g/L (156 mmol/kg). Com tratamento intensivo, incluindo infusão venosa de etanol e bicarbonato, além de hemodiálise, ele sobreviveu e recuperou a visão.

Comentário. O envenenamento por metanol é incomum, mas extremamente danoso. O envenenamento por etilenoglicol é mais comum e exibe características clínicas similares. O sintoma inicial mais importante de envenenamento por metanol é perturbação visual. As evidências laboratoriais de envenenamento por metanol incluem acidose metabólica severa e aumento da concentração do soluto (metanol) no plasma. O metanol é vagarosamente metabolizado até formaldeído, que é então rapidamente convertido em formato pela álcool desidrogenase. O formato acumula durante a intoxicação por metanol e é responsável pela acidose metabólica nos primeiros estágios da intoxicação. Em estágios mais avançados, o lactato também pode acumular como resultado da inibição da respiração pelo formato. O etanol é metabolizado pela álcool desidrogenase, que pode se ligar ao etanol com muito mais afinidade do que se liga ao metanol ou ao etilenoglicol. Assim, o etanol é um agente útil para inibir competitivamente a transformação

metabólica do metanol e do etilenoglicol em metabólitos tóxicos. O etilenoglicol ou o metanol que não foi metabolizado é gradualmente excretado na urina. Pronto tratamento com etanol, juntamente com álcali para combater a acidose e a hemodiálise para remover o metanol e seus metabolitos tóxicos, enseja um bom prognóstico.

Tanto a K_m quanto a V_{max} diminuem na inibição acompetitiva

Um inibidor acompetitivo liga-se somente ao complexo enzima-substrato e nunca à enzima livre. A equação a seguir mostra o esquema de reação da inibição acompetitiva. Nesse caso, K_i é a constante de dissociação do complexo enzima-substrato-inibidor (ESI).

$$E + S \rightleftharpoons ES \overset{+I \rightleftharpoons ESI}{\searrow E+P}$$

O inibidor causa um decréscimo na V_{max} porque uma fração do complexo enzima-substrato é desviada pelo inibidor para formar o complexo ESI inativo. A ligação do inibidor e o aumento da concentração do complexo ESI podem também afetar a dissociação do substrato, causando um decréscimo aparente da K_m, isto é, um aumento aparente da afinidade da enzima pelo substrato.

V_{max} decresce na inibição não competitiva.

Um inibidor não competitivo pode ligar-se tanto à enzima livre como ao complexo enzima-substrato. Assim sendo, a inibição não competitiva é mais complexa que os outros tipos de inibição. A equação a seguir mostra o esquema reacional observado na inibição não competitiva.

$$\begin{array}{ccccc} E & + & S & \rightleftharpoons & ES \rightarrow E + P \\ + & & & & + \\ I & & & & I \\ \Updownarrow & & & & \Updownarrow \\ EI & & & & ESI \end{array}$$

Muitas drogas e venenos inibem enzimas irreversivelmente

Prostaglandinas são mediadores inflamatórios-chave. Sua síntese é iniciada por oxidação, mediada pela ciclo-oxigenase, e formação de um ciclo na estrutura do araquidonato sob condições inflamatórias (Cap. 40). Os compostos supressores da ciclo-oxigenase apresentam atividade anti-inflamatória. A aspirina (ácido acetilsalicílico), uma das drogas mais populares, inibe a atividade da ciclo-oxigenase ao acetilar sua Ser^{530}, o que bloqueia o acesso do araquidonato ao sítio ativo da

enzima. Outras drogas anti-inflamatórias não esteroides (AINES), como a indometacina, inibem a ciclo-oxigenase pelo bloqueio do sítio de ligação do araquidonato.

INIBIÇÃO DE ENZIMAS: INIBIÇÃO DO ESTADO DE TRANSIÇÃO E SUBSTRATO SUICIDA

As enzimas catalisam reações porque induzem o estado de transição da reação. Logo, deve ser possível construir moléculas que se ligam muito fortemente à enzima se a sua estrutura mimetizar o estado de transição do substrato. Os estados de transição em si não podem ser isolados porque eles não são um arranjo estável de átomos e porque algumas de suas ligações são apenas parcialmente formadas ou quebradas. No entanto, para algumas enzimas, podem ser sintetizados análogos que, embora estáveis, ainda mostram algumas das características estruturais do estado de transição.

A penicilina (Fig. 6.9) é um bom exemplo de análogo do estado de transição. Ela inibe a transpeptidase que catalisa as ligações cruzadas entre os filamentos de peptidioglicanas da parede da célula bacteriana, a última etapa da síntese da parede das bactérias. A penicilina tem um anel lactama estendido de quatro membros que mimetiza o estado de transição do substrato normal. Quando a penicilina se liga ao sítio ativo da enzima, seu anel lactama abre, formando uma ligação covalente com um resíduo de serina no sítio ativo. A penicilina é um potente inibidor irreversível da síntese da parede bacteriana, tornando a bactéria osmoticamente frágil e incapaz de sobreviver no organismo.

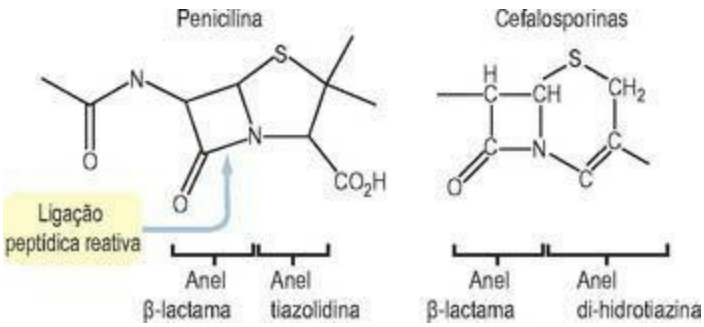


Fig. 6.9 Estrutura da penicilina mostrando a ligação peptídica reativa no anel β-lactama e o centro estrutural das cefalosporinas. As penicilinas contêm o anel β-lactama conjugado ao anel tiazolidina. As cefalosporinas são outra classe de compostos contendo o anel β-lactama fundido ao anel di-hidrotiazina de seis membros. Devido à sua eficiência e falta de toxicidade, os compostos β-lactama são antibióticos amplamente usados. Bactérias com β-lactamase, que quebra o anel β-lactama, são resistentes a esses antibióticos.

O dissulfiram (Antabuse®) é uma droga usada para o tratamento do alcoolismo. O álcool é metabolizado em duas etapas até formar ácido acético. A primeira enzima, a álcool desidrogenase, produz acetaldeído, que é então convertido em ácido acético pela aldeído desidrogenase. Esta última tem no sítio ativo um resíduo de cisteína que é irreversivelmente modificado pelo dissulfiram, o que resulta em acumulação de álcool e acetaldeído no sangue. As pessoas que ingerem dissulfiram ficam nauseadas devido ao acúmulo de álcool e acetaldeído no sangue e demais tecidos, o que leva à abstinência alcoólica.

Agentes alquilantes como a iodoacetamida (ICH_2CONH_2) inibem irreversivelmente a atividade catalítica de algumas enzimas por modificação de resíduos essenciais de cisteína. Metais pesados, tais como sais de mercúrio e chumbo, também inibem enzimas com sítios ativos que contêm grupos

sulfidrila. Os adutos de mercúrio podem ser desfeitos por compostos contendo tiol. Ovos ou clara de ovos são algumas vezes administrados como antídotos para ingestão acidental de metais pesados; a proteína da clara de ovo, a ovalbumina, é rica em grupos sulfidrila, capta os íons de metais livres e evita a absorção deles no trato gastrointestinal.

Em muitos casos, os inibidores irreversíveis são usados para identificar resíduos de sítios ativos envolvidos na catálise enzimática e para aprofundar mais os conhecimentos sobre o mecanismo de ação de uma enzima. Pelo sequenciamento ou análise espectrométrica do peptídio modificado é possível identificar o aminoácido que foi especificamente afetado pelo inibidor e que toma parte na catálise.

REGULAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Em vias metabólicas de múltiplas etapas, a etapa mais lenta limita a velocidade da reação. Assim, é mais eficiente regular uma via metabólica pelo controle de enzimas-chave que estão envolvidas nessa etapa limitante da velocidade. Em geral, cinco mecanismos independentes estão envolvidos na regulação da atividade enzimática.

- A expressão da proteína enzima por seus correspondentes genes muda em resposta a mudanças do ambiente das células ou por causa de demandas metabólicas.

- Enzimas podem ser irreversivelmente ativadas ou inativadas por enzimas proteolíticas.

- Enzimas podem ser irreversivelmente ativadas ou inativadas por modificação covalente, como fosforilação.

- A regulação alostérica modula a atividade de enzimas-chave por ligação de pequenas moléculas em sítios diferentes do sítio ativo em um processo que é relativamente rápido e, daí, a primeira resposta das células à mudança de condições.

- A degradação de enzimas por proteases intracelulares dos lisossomos ou pelos proteossomos no citosol também determina o tempo de permanência das enzimas e, consequentemente, a atividade enzimática ao longo de um período de tempo maior.

Ativação proteolítica de enzimas da digestão

Algumas enzimas são estocadas numa organela ou em um compartimento específico, como em vesículas celulares de exocitose, na forma de precursores inativos denominados pró-enzimas ou zimogênios. Muitas enzimas digestivas são estocadas no pâncreas como zimogênios inativos. Os zimogênios são secretados no suco pancreático em seguida a uma refeição e ativados no trato gastrointestinal; tripsinogênio é convertido em tripsina pela ação da enteropeptidase intestinal. Essa enzima fica na superfície interna do duodeno e hidrolisa o peptídio *N*-terminal do tripsinogênio inativo. O rearranjo da estrutura terciária do produto resulta na forma proteoliticamente ativa da tripsina. A tripsina ativa digere outros zimogênios, tais como pró-carboxipeptidase, pró-elastase e quimotripsinogênio, bem como outras moléculas de tripsinogênio (Cap. 10). Cascatas proteolíticas similares são observadas durante a coagulação do sangue e a fibrinólise (dissolução dos coágulos) (Cap. 7).

Sendo o pâncreas um órgão importante para controlar a glicose do sangue, a ativação descontrolada dessas enzimas causaria inflamação e destruição do pâncreas (pancreatite), possivelmente levando à destruição das células β e ao desenvolvimento do diabetes.

A curva de saturação do substrato para uma enzima "isostérica" (de um único formato) é hiperbólica (Fig. 6.5A). Diferentemente, as curvas de velocidade de reação *versus* concentração de substrato [S] das enzimas alostéricas mostram gráficos sigmoides (Fig. 6.10). Uma molécula de efetor alostérico liga-se na enzima em um sítio que é distinto e fisicamente separado do sítio de ligação do substrato, afetando a ligação do substrato (K_m) e/ou k_{cat}. Em alguns casos, o substrato pode exercer efeitos alostéricos, o que é considerado um efeito homotrópico. Se um efetor alostérico é diferente do substrato, o efeito é chamado heterotrópico. Efeitos homotrópicos são observados quando a reação de uma molécula de substrato com uma enzima multimérica afeta a ligação de uma segunda molécula do substrato em um diferente sítio ativo da enzima. A interação entre as subunidades faz a ligação do substrato ficar cooperativa e resulta em uma curva sigmoide no gráfico v *versus* [S]. Esse efeito é em sua essência idêntico à quele descrito para ligação do O_2 na hemoglobina (Cap. 5), exceto que, no caso das enzimas, a ligação do substrato leva a uma reação catalisada por enzima.

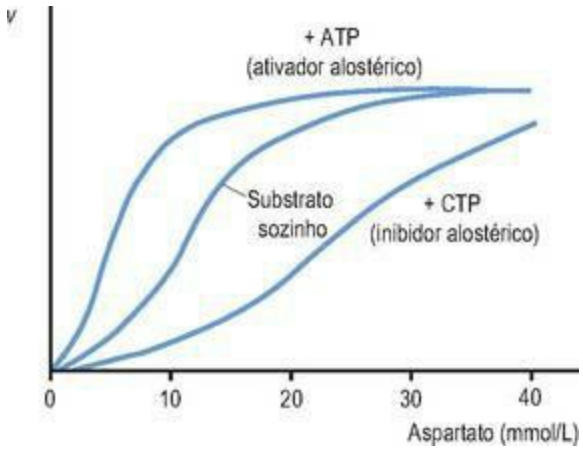


Fig. 6.10 Regulação alostérica da ATCase. Gráfico de velocidade (v) *versus* concentração de substrato na presença de um ativador ou inibidor alostérico. Aspartato transcarbamoilase (ATCase) é um exemplo de enzima alostérica. O aspartato (substrato) regula homotropicamente a atividade da ATCase, segundo uma cinética sigmoide. CTP, um produto final, inibe heterotropicamente, mas ATP, um precursor, ativa heterotropicamente a ATCase. Essa enzima é descrita com mais detalhes no capítulo 30 (Fig. 5.7).

A HEMOFILIA É CAUSADA POR UM DEFEITO NA ATIVAÇÃO DE UM ZIMOGÊNIO

Uma criança foi internada em um hospital com sangramento muscular que afetava o nervo femoral. Achados laboratoriais indicaram desordem da coagulação do sangue, hemofilia A, que resulta da deficiência do fator VIII. Administrou-se o fator VIII ao paciente para restaurar a atividade de coagulação do sangue.

Comentário. A formação de um coágulo sanguíneo resulta de uma cascata de reações de ativação de zimogênios. Mais de uma dúzia de proteínas diferentes conhecidas como fatores de coagulação sanguínea está envolvida. Na etapa final, o coágulo é formado pela conversão de uma proteína solúvel, o fibrinogênio (fator I), em um produto insolúvel fibroso, a fibrina, que forma a matriz do coágulo. Esta última etapa é catalisada por uma serina protease, a trombina (fator IIa). A hemofilia é

uma desordem da coagulação do sangue causada por um defeito em um dos fatores da sequência das reações. A hemofilia A, uma forma principal (85%) de hemofilia, é causada por um defeito no fator de coagulação VIII (Cap. 7).

ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDIOS SÃO USADOS COMO AGENTES ANTIVIRAIS

Análogos de nucleosídios, como aciclovir e ganciclovir, vêm sendo usados para o tratamento do herpesvírus simplex (HSV), da varicela-zoster (VZV) e do citomegalovírus (CMV). Essas substâncias são pró-drogas ativadas por fosforilação e paralisam a síntese do DNA viral pela inibição da sua DNA polimerase. A timidina quinase (TK) dos vírus, mais propriamente uma quinase de nucleosídios, fosforila nucleosídios para formar seus monofosfatos. Quinases celulares, a seguir, adicionam um fosfato para formar compostos trifosfatos ativos, que são inibidores competitivos da DNA polimerase viral durante a replicação do DNA (Cap. 31). Enquanto a TK viral tem baixa especificidade para o substrato e fosforila eficientemente análogos de nucleosídios, as nucleosídios quinases das células têm alta especificidade pelos seus substratos e quase não fosforilam os análogos de nucleosídios. Assim, as células infectadas pelos vírus estão inclinadas a sofrer arresto em um estágio específico do ciclo celular, o ponto de controle G_2-M (Cap. 43), mas as células não infectadas são resistentes aos análogos dos nucleosídios.

Cooperatividade positiva e negativa

A cooperatividade positiva indica que a reação de um substrato com um sítio ativo deixa mais fácil a reação de outro substrato em outro sítio ativo. A cooperatividade negativa significa que a reação de um substrato com um sítio ativo torna mais difícil para um substrato reagir em outro sítio ativo. Desde que a afinidade da enzima muda com a concentração do substrato, ela não pode ser descrita pela cinética simples de Michaelis-Menten. Ao contrário, a cooperatividade é caracterizada pela concentração de substrato que permite a metade da velocidade máxima, $[S]_{0,5}$, e o coeficiente de Hill (H) (Cap. 5). Os valores de H são maiores que 1 para as enzimas que apresentam cooperatividade positiva e menores do que 1 para aquelas com cooperatividade negativa. As concentrações intracelulares dos substratos da maioria das enzimas alostéricas são mantidas ao redor do valor $[S]_{0,5}$, tal que a atividade da enzima responde a pequenas mudanças da concentração do seu substrato.

O modelo mais frequentemente referido para compreender o comportamento alostérico foi estabelecido por Monod, Wyman e Changeaux, o chamado modelo concertado (Fig. 6.11). Como no caso da ligação do O_2 com a hemoglobina, na ausência de substrato, a enzima tem baixa afinidade pelo substrato e está no estado T (tenso). A outra conformação da enzima é o estado R (relaxado). A ligação de moléculas do efetor alostérico muda uma fração da enzima de um estado para o outro. Enzimas mudam para o estado R pela ligação de moléculas de efetores positivos, mas elas são estabilizadas na forma T pelas moléculas dos efetores alostéricos negativos. Nesse modelo, todos os sítios ativos em estado R são os mesmos e todos têm maior afinidade pelo substrato que no estado T. Porque a transição entre os estados T e R ocorre ao mesmo tempo para todas as subunidades, este é

chamado de modelo concertado (de dois estados). Um modelo alternativo, chamado modelo sequencial (multiestado) foi proposto por Koshland, Nèmethy e Filmer. Ele postula que cada subunidade muda independentemente para uma conformação diferente e que as diferentes subunidades podem ter diferentes afinidades para o substrato. Hoje se reconhece que ambos os modelos são aplicáveis para diferentes enzimas.

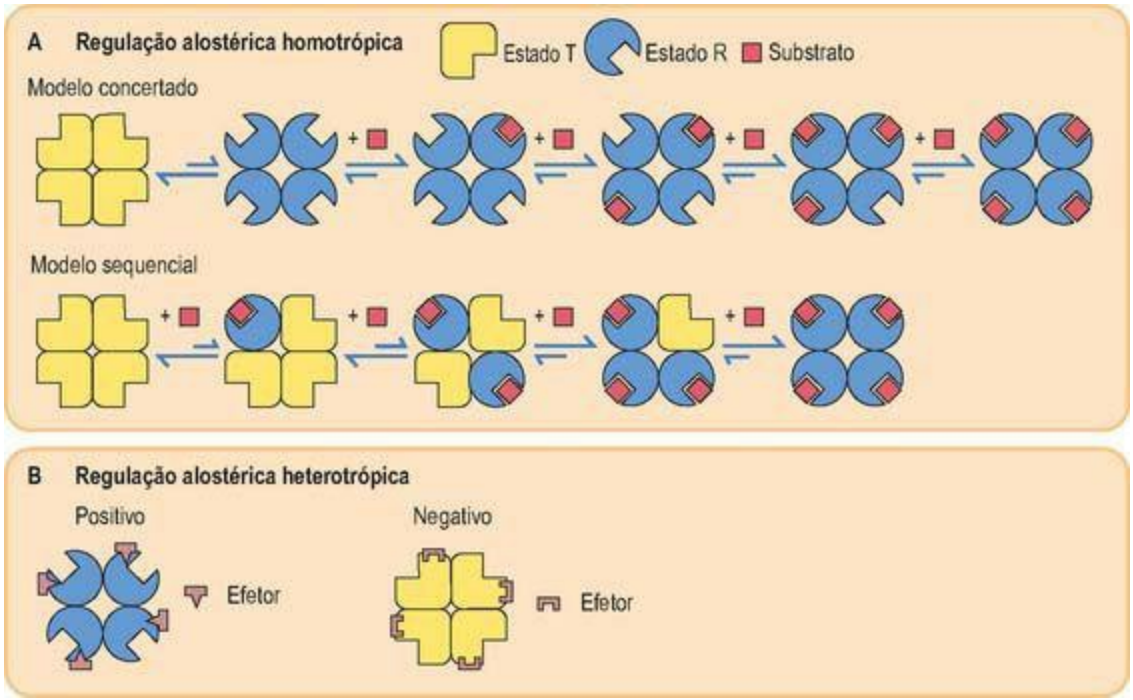


Fig. 6.11 Representação esquemática da regulação alostérica. (A) Na regulação homotrópica, o substrato age como um efetor alostérico. Dois modelos são apresentados. No modelo concertado, todas as subunidades convertem-se do estado T (tenso; baixa afinidade pelo substrato) para o estado R (relaxado; alta afinidade pelo substrato) ao mesmo tempo; no modelo sequencial elas mudam uma por uma, em cada reação de ligação do substrato. (B) Na regulação heterotrópica, o efetor é diferente do substrato e liga-se em um sítio estruturalmente diferente na enzima. Efetores positivos e negativos estabilizam a enzima nos estados R e T, respectivamente.

ENVENENAMENTO POR INSETICIDA

Um homem de 55 anos de idade estava borrifando um inseticida composto por fluorofosfatos orgânicos em um campo de arroz. Subitamente, ele sentiu dor de cabeça frontal, dor nos olhos e aperto no peito, sinais típicos da superexposição a fluorofosfatos orgânicos tóxicos. Levado a um hospital e tratado com injeção intravenosa de 2 mg de sulfato de atropina, recuperou-se pouco a pouco.

Comentário. Fluorofosfatos orgânicos formam complexos covalentes fosforil-enzima com serinaproteases e esterases, tais como a acetilcolinesterase. Assim inibem irreversivelmente essas enzimas. A acetilcolinesterase encerra a ação da acetilcolina durante a atividade neuromuscular (Cap. 42) ao hidrolisá-la em acetato e colina. A inibição dessa enzima prolonga a ação da acetilcolina, levando a constante estimulação neuromuscular. A atropina não afeta a atividade da acetilcolinesterase, mas bloqueia competitivamente a ligação da acetilcolina e a estimulação na junção neuromuscular.

MEDIDA ENZIMÁTICA DA GLICOSE NO SANGUE

O ensaio glicose-oxidase peroxidase

Nos laboratórios clínicos, hoje em dia, a glicose do plasma e da urina é medida por métodos enzimáticos automáticos. O procedimento mais usual é feito com uma mistura de glicose oxidase e peroxidase (Fig. 6.12). A glicose oxidase é altamente específica para a glicose, mas oxida somente o anômero β do açúcar, o que representa aproximadamente 64% da glicose em solução. A mistura do ensaio é, em vista disso, suplementada com mutarotase, que catalisa rapidamente a conversão dos anômeros e aumenta em mais de 50% a sensibilidade do ensaio. A H_2O_2 produzida na reação da oxidase é depois usada por uma reação de peroxidase para oxidar um cromógeno, que será transformado em cromóforo colorido. A cor resultante é diretamente proporcional ao conteúdo de glicose da amostra. Existem versões fluorométricas desse ensaio para alta sensibilidade, e um analisador comercial usa um eletrodo de oxigênio para medir a velocidade de decréscimo na concentração de oxigênio da amostra, que é também diretamente proporcional à concentração de glicose.

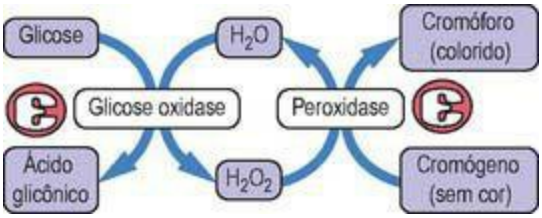


Fig. 6.12 O ensaio glicose oxidase/peroxidase para glicose sanguínea. A cor produzida nesse ensaio é diretamente proporcional à concentração da glicose sanguínea.

Tiras reagentes e glicômetros

Pessoas com diabetes normalmente monitoram os níveis de glicose no sangue muitas vezes ao longo do dia usando tiras reagentes e medidores de glicose. As fitas são impregnadas com um reagente de glicose oxidase-peroxidase (GOP). Na versão não automática desse ensaio, a extensão da alteração da cor numa tira molhada de sangue está relacionada à concentração de glicose — tipicamente em uma escala de 1 a 4. Glicômetros modernos usam uma pequena gota de sangue (~1 μL) e eletrodos amperométricos para medir a corrente produzida pela reação redox catalisada pela glicose desidrogenase (GDH), que oxida a glicose a ácido glicônico, mas reduz a coenzima em lugar do oxigênio. Tais ensaios são usados geralmente quando são necessárias medidas rápidas e frequentes da glicose sanguínea. Quando ensaios GOP e GDH foram comparados a alta altitude numa subida ao monte Kilimanjaro, o ensaio GOP, que depende do oxigênio ambiente, mostrou um erro maior. Ambos os processos são menos acurados a baixas temperaturas e alta altitude.

Ensaios cinéticos

No ensaio descrito na Figura 6.12 e posto em gráfico quando usadas várias concentrações de glicose na Figura 6.13A, deixa-se a reação ocorrer até o seu fim, isto é, até que a quantidade total de glicose tenha sido oxidada, quando então é medida a mudança de cor. Então, a cor produzida é plotada em um gráfico contra um padrão para determinar a concentração da glicose sanguínea (Fig. 6.13B). Analisadores cinéticos de resposta ultrarrápida estimam a concentração de glicose numa amostra medindo a velocidade inicial da reação. A análise do gráfico cinético na Figura 6.13A, por exemplo, indica que ambas as determinações, de término de progresso da reação "endpoint" ou cinética da glicose oxidase, dependem da concentração de glicose. Assim, para estimar a concentração da glicose em uma amostra (Fig. 6.13C), o analisador pode medir a mudança na absorvância (ou algum outro parâmetro) durante os tempos iniciais da reação e comparar essa velocidade com a de uma solução padrão. Esses ensaios são feitos em analisadores de fluxo ou de centrifugação para garantir mistura rápida dos reagentes com a amostra. Analisadores cinéticos são inerentemente mais rápidos do que os ensaios de término (*endpoint*) porque eles estimam a concentração de glicose antes que do término. Esses ensaios funcionam porque a glicose oxidase e a glicose desidrogenase têm uma K_m alta para a glicose. Nas concentrações de glicose encontradas no sangue, a velocidade da reação da oxidase é proporcional à concentração de glicose, isto é, na região de primeira ordem da equação de Michaelis-Menten em que a concentração de substrato é menor do que a K_m (Fig. 6.5A).

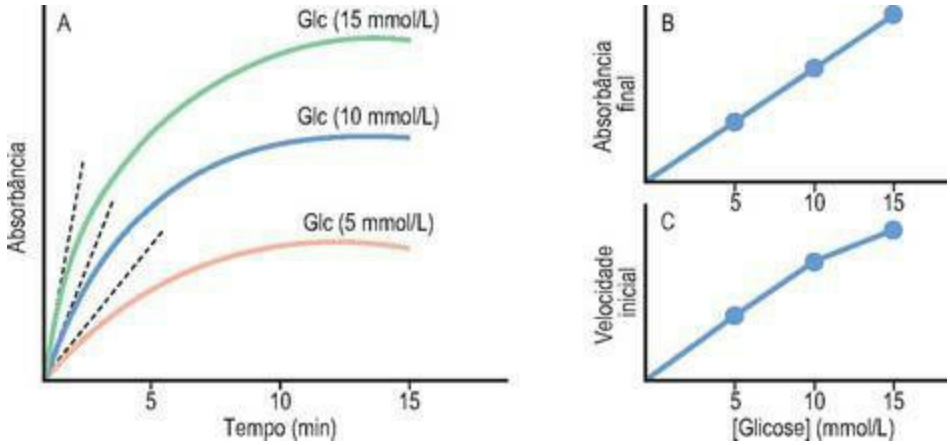


Fig. 6.13 Ensaios glicose oxidase/peroxidase — ensaios de término "endpoint" *versus* ensaios cinéticos. (A) Análise gráfica de um ensaio de término "endpoint". (B) As absorbâncias finais ("endpoint") são plotadas como função da concentração de glicose, fornecendo uma linha reta. (C) Velocidades iniciais das reações são estimadas por medidas múltiplas nos instantes iniciais do ensaio (linhas pontilhadas na moldura A) e plotadas *versus* a concentração de glicose. Gráficos não lineares, quando obtidos, são analisados em computador.

Resumo

A maior parte do metabolismo é catalisada por catalisadores biológicos chamados de enzimas. Suas atividades catalíticas acontecem à temperatura corporal e elas são estritamente controladas por vários mecanismos. As modificações covalente e não covalente estão envolvidas nessa regulação e permitem controle metabólico eficiente. A atividade enzimática pode ser inibida (ou ativada) por compostos sintéticos (drogas), compostos exógenos (toxinas) e compostos endógenos (efetores alostéricos). A análise cinética da reação enzimática é útil para avaliar o papel biológico das enzimas e para elucidar os seus mecanismos de reação. Além disso, ensaios de enzimas no sangue são úteis para o diagnóstico de algumas doenças.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Qual é o ponto mais efetivo para controlar o fluxo de substrato por um caminho metabólico que acontece em uma sequência de reações enzimáticas? Que efeito terá um inibidor de uma enzima limitante de velocidade sobre a concentração dos substratos de uma via multissequencial?

2. A maior parte das drogas é estruturada para inibir enzimas específicas dos sistemas biológicos. A droga Prozac tem tido profundo efeito no tratamento médico da depressão. Reveja a história de desenvolvimento do Prozac ilustrando a importância da especificidade para o mecanismo da ação dessa droga.

3. Discuta alguns exemplos de inibidores enzimáticos reversíveis e irreversíveis que são usados na prática médica.

4. Camundongos nocauteados são camundongos que perderam um gene específico. Discuta o impacto de camundongos nocauteados para direcionar o desenvolvimento de drogas na indústria farmacêutica.

Leituras sugeridas

Crusat M, de Jong M. Neuraminidase inhibitors and their role in avian and pandemic influenza. *Antivir Ther*. 2007;12:593-602.

Lopez-Otin C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:800-808.

Matchar DB, McCrory DC, Orlando LA, et al. Systematic review: comparative effectiveness of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers for treating essential hypertension. *Ann Intern Med*. 2008;148(1):16-29.

Nordlund P, Reichard P. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:681-706.

Öberg D, Östenson C-G. Performance of glucose dehydrogenase-and glucose oxidase-based blood glucose meters at high altitude and low temperature. *Diabetes Care*. 2005;28:1261.

Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*. 2006;86:583-650.

Stancoven A, McGuire DK. Preventing macrovascular complications in type 2 diabetes mellitus: glucose control and beyond. *Am J Cardiol*. 2007;99(11A):5H-11H.

Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology*. 2007;132:1557-1573.

Sites

Enzimologia clínica Enzimologia clínica. www.labtestsonline.org/.

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. www.ifcc.org/.

Novos artigos em enzimologia Novos artigos em enzimologia. www.newsrx.com/library/topics/Enzymology.html.

Banco de dados sobre estrutura de enzimas Banco de dados sobre estrutura de enzimas. www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/.

Mecanismo de ação Mecanismo de ação da quimotripsina. www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm258/lecture12.pdf.

Serina proteases Serina proteases. www.med.unibs.it/~marchesi/pps97/course/section12/serprot1.html.

Nomenclatura das enzimas Nomenclatura das enzimas. www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/.

Classificação Classificação das enzimas. www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/rules.html.

Hemostasia e Trombose

G. Lowe

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os mecanismos sequenciais envolvidos na hemostasia normal.
- Resumir os processos pelos quais a parede do vaso regula a hemostasia e a trombose.
- Descrever o papel das plaquetas na hemostasia e na trombose.
- Descrever as vias através das quais as drogas antiplaquetárias atuam.
- Descrever as vias da coagulação sanguínea e como elas são avaliadas em laboratório clínico para a identificação de distúrbios da coagulação.
- Descrever os inibidores fisiológicos da coagulação sanguínea.
- Descrever as vias através das quais as drogas anticoagulantes atuam.
- Descrever os principais componentes do sistema fibrinolítico.
- Descrever como as drogas trombolíticas (fibrinolíticas) atuam.

INTRODUÇÃO

A circulação do sangue dentro do sistema cardiovascular é essencial para o transporte de gases, nutrientes, minerais, produtos metabólicos e hormônios entre os diferentes órgãos. Também é essencial que o sangue não extravase excessivamente para fora dos vasos sanguíneos quando os mesmos sofrem lesões causadas por traumas da vida diária. A evolução animal resultou, portanto, no desenvolvimento de uma série eficiente, porém complexa, de mecanismos hemodinâmicos, celulares e bioquímicos, que limita a perda sanguínea através da formação de tampões de plaqueta-fibrina nos locais de lesão vascular (hemostasia). Os distúrbios genéticos que resultam na perda da função de proteínas específicas e, consequentemente, em sangramento excessivo (p. ex., hemofilia) têm se mostrado importante na identificação de muitos mecanismos bioquímicos da hemostasia.

É fundamental também que esses mecanismos hemostáticos sejam controlados adequadamente por mecanismos inibitórios; caso contrário, a formação exagerada de tampão de plaqueta-fibrina pode levar à oclusão local de um vaso sanguíneo importante (artéria ou veia) no seu sítio de origem (trombose) ou o tampão pode se soltar e bloquear um vaso sanguíneo mais adiante (*downstream*) (embolia). A trombose arterial é a principal causa de ataques cardíacos, acidente vascular cerebral e amputações não traumáticas de membros nos países desenvolvidos. A trombose venosa e a embolia são também causas importantes de óbito e invalidez. O uso clínico de drogas antitrombóticas (antiplaquetárias, anticoagulantes e agentes trombolíticos) é agora amplamente disseminado em países desenvolvidos e requer a compreensão de como elas interferem nos mecanismos hemostáticos para exercerem seus efeitos antitrombóticos.

HEMOSTASIA

Hemostasia significa "parada de sangramento"

Após a lesão do tecido, que leva à ruptura de vasos menores (incluindo traumas diários, injeções, incisões cirúrgicas e extrações dentárias), normalmente ocorre uma série de interações entre a parede do vaso e o sangue circulante, o que resulta na interrupção da perda sanguínea pelos vasos lesionados dentro de poucos minutos (hemostasia). A hemostasia é o resultado do selamento eficaz dos vasos que sofreram rupturas por um tampão hemostático composto de plaquetas sanguíneas e fibrina. A fibrina é derivada do fibrinogênio circulante, enquanto as plaquetas são pequenos fragmentos celulares que circulam no sangue e desempenham uma função no início da hemostasia.

A hemostasia requer a função coordenada e eficaz dos vasos sanguíneos, das plaquetas, dos fatores da coagulação e do sistema fibrinolítico

A Figura 7.1 fornece um esquema geral dos mecanismos hemostáticos e ilustra algumas das interações entre os vasos sanguíneos, as plaquetas e o sistema de coagulação na hemostasia; cada um desses componentes da hemostasia também interage com o sistema fibrinolítico. A resposta inicial dos pequenos vasos sanguíneos à lesão é a vasoconstrição arteriolar, o que reduz temporariamente o fluxo sanguíneo local. A redução do fluxo diminui transitoriamente a perda sanguínea e pode também promover a formação do tampão de plaqueta-fibrina. Após a ativação das plaquetas sanguíneas, ocorre a adesão das mesmas à parede do vaso no local da lesão e posterior agregação de umas com as outras, levando à construção de uma massa oclusiva de plaquetas e formação do tampão hemostático inicial (primário). Esse tampão de plaquetas é friável e, a menos que seja posteriormente estabilizado pela fibrina, será levado embora pela pressão sanguínea local quando a vasoconstrição for revertida.

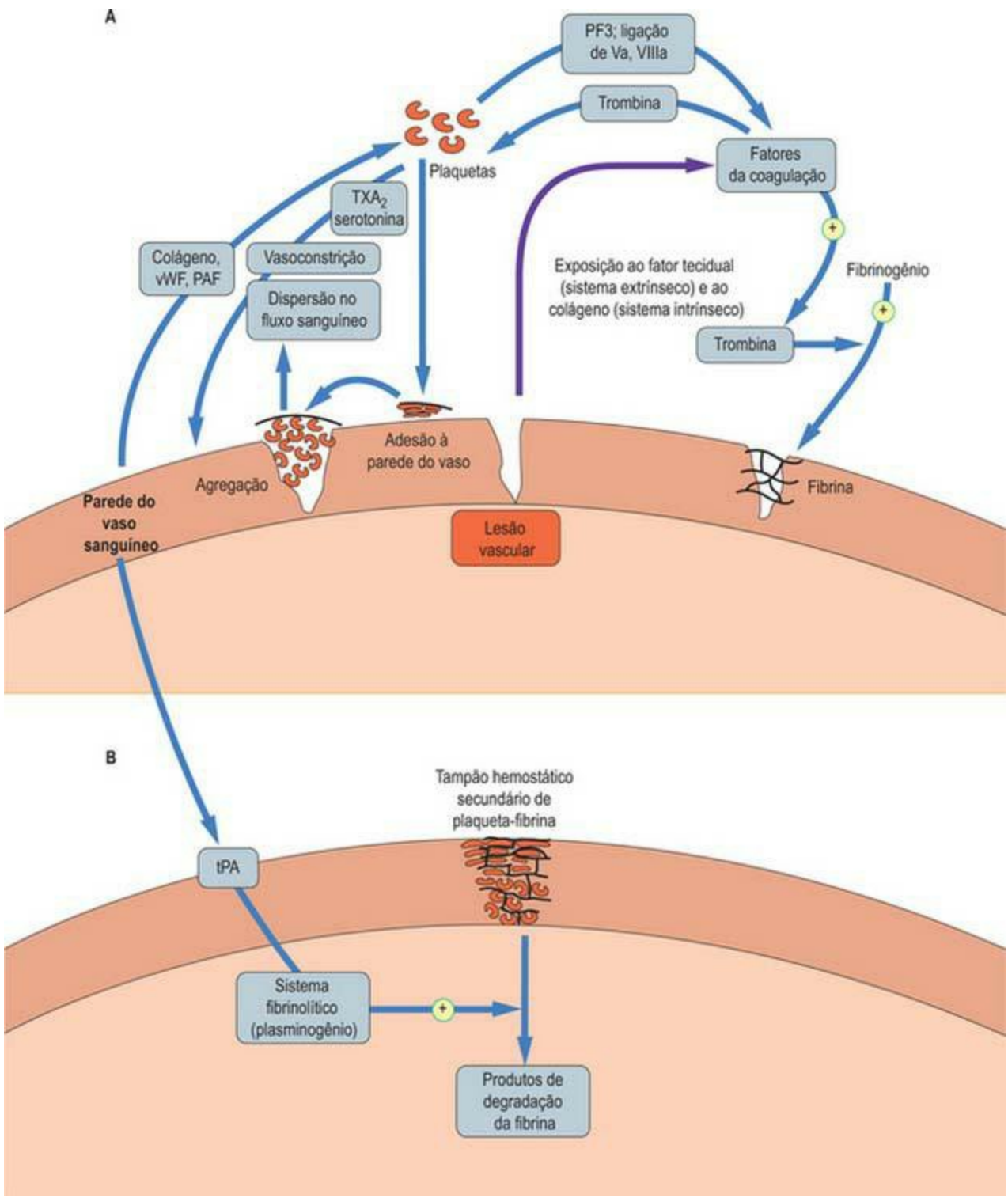


Fig. 7.1 Esquema geral dos mecanismos hemostáticos. (A) A lesão vascular estabelece uma série de eventos que culminam na formação de um tampão plaquetário primário. Este pode se dispersar pelo fluxo sanguíneo ao longo dos vasos, a menos que o tampão seja estabilizado. (B) O tampão primário é estabilizado por uma rede de fibrina (formada a partir do fibrinogênio com ligações cruzadas). O tampão secundário é estável e só será degradado quando o sistema fibrinolítico for ativado. PAF, fator de ativação de plaquetas; PF3, fator plaquetário 3; tPA, ativador do plasminogênio tecidual; TXA_2, tromboxano A_2; Va, fator V da coagulação ativado; VIIIa, fator VIII da coagulação ativado; vWF, fator de von Willebrand.

A lesão vascular também ativa os fatores de coagulação que interagem sequencialmente para gerar a trombina, que é responsável pela conversão do fibrinogênio plasmático, circulante e solúvel, em fibrina, com ligações cruzadas e insolúvel. Esta forma o tampão hemostático subsequente (secundário), o qual é relativamente resistente à dispersão pelo fluxo sanguíneo ou fibrinólise. Existem duas vias de ativação dos fatores de coagulação: a via extrínseca, que é iniciada pela

exposição do sangue circulante ao fator tecidual, liberado pelo tecido subendotelial; e a via intrínseca, que desempenha papel importante na amplificação da geração de trombina e fibrina.

A lise da fibrina é tão importante para a saúde quanto a sua formação

A hemostasia é um processo contínuo ao longo da vida, e resultaria em formação excessiva de fibrina e oclusão vascular se não fosse controlada. A evolução produziu, então, um sistema fibrinolítico; este é ativado pela formação de fibrina local, resultando na geração local de plasmina, uma enzima que digere os tampões de fibrina (paralelamente aos processos de reparo tecidual), mantendo, assim, a desobstrução vascular. A digestão da fibrina resulta na formação de produtos de degradação da fibrina (FDP) circulantes. Esses produtos são detectados no plasma de indivíduos saudáveis em baixas concentrações, o que demonstra que a formação e a lise de fibrina são processos contínuos na saúde.

O sangramento excessivo pode resultar de defeitos em cada um dos componentes da hemostasia, os quais podem ser causados por doença (congênita ou adquirida) ou pelo uso de drogas antitrombóticas (Tabela 7.1).

Tabela 7.1 Causas congênitas e adquiridas de sangramento excessivo. GPIb-IX, GPIIb-IIIa, receptores glicoproteicos Ib-IX e IIb-IIIa; PAI-1, inibidor 1 do ativador de plasminogênio

Causas de sangramento excessivo		
	Congênitas	**Adquiridas**
Parede do vaso	distúrbios da síntese de colágeno (síndrome de	deficiência de vitamina C (escorbuto) excesso de corticosteroides)

Plaquetas	Ehlers—Danlos) deficiência de vWF (doença de von Willebrand) deficiência de GPIb-IX plaquetária (síndrome de Bernard—Soulier) deficiência de GPIIb-llla plaquetária (trombasteniade Glanzmann)	drogas antiplaquetárias (p. ex., Aspirina®) formação defeituosa de plaquetas destruição excessiva de plaquetas
Coagulação	deficiências de fatores de coagulação (hemofilias): fator VIII fator IX fator XI fibrinogênio etc.	defidênda de vitamina K (fatores II, VII, IX, X) anticoagulantes orais (antagonistas da vitamina K, p. ex., varfarina) doenças hepáticas coagulação intravascular disseminada (CID)
Fibrinólise	deficiência de antiplasmina deficiência de PAI-1	drogas fibrinolíticas (p. ex. tPA, uroquinase, estrepto-quinase)

Os componentes vasculares, plaquetários, de coagulação e fibrinolíticos da hemostasia serão discutidos a seguir.

A PAREDE DO VASO

A lesão vascular tem um papel-chave no início da formação local do tampão de plaqueta-fibrina e na sua posterior remoção pelo sistema fibrinolítico

Todos os vasos sanguíneos são revestidos por uma camada plana de células endoteliais, as quais têm funções importantes na troca de substâncias químicas, células e micro-organismos entre o sangue e os tecidos corporais. As células endoteliais nos vasos sanguíneos pequenos (capilares) são sustentadas por uma fina camada de tecido conjuntivo, rico em fibras de colágeno, denominada íntima. Nas veias, uma camada estreita (a média) de células de músculo liso contrátil permite alguma vasoconstrição: por exemplo, as veias superficiais sob a pele se contraem em resposta ao resfriamento da superfície. Nas artérias e arteríolas, uma camada muscular bem desenvolvida permite potente vasoconstrição, incluindo a vasoconstrição após o dano local, que constitui parte da resposta hemostática. Os vasos de maior calibre também possuem o tecido conjuntivo de sustentação na camada mais externa (a adventícia).

O endotélio normal possui uma superfície antitrombótica

O endotélio normal intacto não inicia ou mantém a adesão plaquetária ou a coagulação sanguínea. Sua superfície é antitrombótica. Essa resistência à formação de trombos é, em parte, devida à produção pelo endotélio de dois potentes vasodilatadores e inibidores da função plaquetária: a prostaciclina (prostaglandina I_2, PGI_2) e o óxido nítrico, também conhecido como fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) (quadro da pág. 76).

A vasoconstrição que ocorre após a lesão vascular é parcialmente mediada por dois produtos da ativação plaquetária: a serotonina (5-hidroxitriptamina) e o tromboxano A_2 (TXA_2), um produto do metabolismo de prostaglandinas da plaqueta. Além disso, após a lesão vascular que desfaz o revestimento de célula endotelial, o fluxo sanguíneo é exposto ao colágeno subendotelial, que ativa a via intrínseca da coagulação sanguínea. O dano à célula endotelial também expõe o fluxo sanguíneo ao fator tecidual subendotelial, que ativa a via extrínseca da coagulação sanguínea (Fig. 7.1).

PROSTACICLINA E ÓXIDO NÍTRICO

A exposição do fluxo sanguíneo ao colágeno como resultado do dano endotelial também estimula a ativação das plaquetas. As plaquetas se ligam ao colágeno através do fator de von Willebrand (vWF), que é liberado das células endoteliais. O vWF, por sua vez, se liga tanto às fibras de colágeno quanto às plaquetas (via um receptor glicoproteico da membrana de plaquetas, GPIb-IX). O fator de ativação de plaquetas (PAF) da parede do vaso pode também ativar as plaquetas na hemostasia (Fig. 7.1 e quadro da pág. 29).

O colágeno tem um papel-chave na estrutura e na função hemostática de pequenos vasos sanguíneos

Como o colágeno desempenha um papel-chave na estrutura e na função hemostática de pequenos vasos sanguíneos, as causas vasculares de sangramento excessivo incluem as deficiências congênitas ou adquiridas da síntese de colágeno (Tabela 7.1). Os distúrbios congênitos incluem a rara síndrome de Ehlers-Danlos. Os distúrbios adquiridos incluem a deficiência de vitamina C relativamente comum, o escorbuto (Cap. 11) e o excesso de corticosteroides exógenos ou endógenos.

PROSTACICLINA E ÓXIDO NÍTRICO: MEDIADORES BIOQUÍMICOS DA VASOCONSTRIÇÃO E VASODILATAÇÃO

O diâmetro das artérias e arteríolas é constantemente alterado para regular o fluxo sanguíneo de acordo com as necessidades cardiovasculares. Os mecanismos de controle incluem as vias neurogênica (simpática/adrenérgica; Cap. 41) e miogênica, e os mediadores bioquímicos locais, incluindo prostaciclina (PGI_2) e óxido nítrico.

A prostaciclina é o principal metabólito do ácido araquidônico formado pelas células vasculares. Ela é um potente vasodilatador e também um potente inibidor da agregação plaquetária. Tem uma meia-vida curta no plasma (três minutos).

O óxido nítrico é também um potente vasodilatador formado pelas células endoteliais vasculares, também com meia-vida curta. Foi inicialmente chamado de fator relaxante derivado do endotélio (EDRF). Assim como a prostaciclina, sua geração pelas células endoteliais é aumentada por muitos compostos, e também pelo fluxo sanguíneo e força de cisalhamento. Na circulação normal, o óxido nítrico parece ter um papel importante na vasodilatação mediada pelo fluxo sanguíneo. Ele é sintetizado por duas formas distintas de óxido nítrico sintase endoteliais (eNOS): a constitutiva e a induzida. A eNOS constitutiva rapidamente fornece quantidades relativamente pequenas de óxido nítrico por períodos curtos, relacionadas com a regulação do fluxo vascular. Os efeitos benéficos das drogas nitrato na hipertensão e na angina podem, em parte, refletir seus efeitos sobre essa via (Cap. 18). A eNOS induzida é estimulada por citocinas nas reações inflamatórias e libera grande quantidade de óxido nítrico por longos períodos. Sua supressão por glicocorticoides pode parcialmente explicar seu efeito anti-inflamatório.

Tanto a prostaciclina quanto o óxido nítrico parecem exercer suas ações vasodilatadoras ao se difundirem localmente das células endoteliais para as células de músculo liso vasculares, onde elas estimulam a guanilato ciclase, resultando em aumento da formação de 3′,5′-monofosfato de guanosina cíclica (cGMP) e no relaxamento do músculo liso vascular através da alteração da concentração de

cálcio intracelular (Cap. 40).

TROMBOXANO A_2 e ASPIRINA®

Já foi observado que a PGI_2, o principal metabólito do ácido araquidônico formado pelas células vasculares, é um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária. Ao contrário, o principal metabólito do ácido araquidônico formado pelas plaquetas é o tromboxano A_2 (TXA_2), que é um potente vasoconstritor e estimula a agregação plaquetária. Assim como a prostaciclina, o TXA_2 tem uma meia-vida curta. No final da década de 1970, Salvador Moncada e John Vane contrastaram os efeitos de PGI_2 e TXA_2 nos vasos sanguíneos e nas plaquetas, e construíram a hipótese de que um equilíbrio entre esses dois compostos era importante na regulação da hemostasia e da trombose.

As deficiências congênitas de ciclo-oxigenase ou tromboxano sintase (as enzimas envolvidas na síntese de TXA_2) resultam em uma leve tendência ao sangramento. A ingestão, mesmo em doses baixas, de ácido acetilsalicílico (Aspirina®) acetila irreversivelmente a ciclo-oxigenase e suprime a síntese de TXA_2 e a agregação plaquetária por vários dias, resultando em um efeito antitrombótico e uma leve tendência ao sangramento. É provável que o sangramento ocorra especialmente no estômago, como resultado da formação de úlceras gástricas, secundárias à inibição das prostaglandinas citoprotetoras da mucosa gástrica pela Aspirina. Embora em pessoas que apresentem alto risco de trombose arterial (p. ex., infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral prévios) essa tendência ao sangramento seja mais importante do que uma redução do risco de trombose, a Aspirina® é contraindicada para indivíduos com história de distúrbios de sangramento e úlceras estomacais ou duodenais já existentes.

PLAQUETAS

As plaquetas sanguíneas formam o tampão hemostático inicial nos pequenos vasos e o trombo inicial em artérias e veias.

As plaquetas são microcélulas anucleadas, circulantes e com diâmetro médio de 2-3 μm. Elas são fragmentos de megacariócitos da medula óssea e circulam por aproximadamente 10 dias no sangue. A concentração normal de plaquetas no sangue é de 150 – 400 × 10^9/L (150 – 400 × 10^3/mm^3).

Distúrbios de sangramento relacionados às plaquetas

Defeitos congênitos na adesão/agregação plaquetária podem causar o sangramento excessivo por toda a vida

Um simples teste de triagem — medição do tempo de sangramento da pele (faixa normal, 2-10 minutos) — é suficiente para detectar defeitos congênitos da adesão/agregação plaquetária, nos quais os tempos são tipicamente prolongados. O defeito mais comum é a doença de von Willebrand (Tabela 7.1), um grupo de distúrbios autossômicos dominantes que resultam em baixas concentrações plasmáticas de multímeros de vWF. Esses multímeros são compostos por subunidades (peso molecular 250 kDa) que são liberadas por células endoteliais (e grânulos de plaquetas) e circulam no plasma a uma concentração de 1 mg/dL. O vWF não desempenha apenas um papel importante na função hemostática das plaquetas, como também transporta o fator VIII da coagulação (fator anti-hemofílico) na circulação e o leva aos locais de lesão vascular. Portanto, as concentrações plasmáticas do fator VIII podem também estar baixas na doença de von Willebrand. O tratamento dessa doença consiste em aumentar a baixa atividade plasmática de vWF, usualmente por meio da desmopressina (um análogo sintético da vasopressina (Cap. 23) que libera vWF das células endoteliais no plasma). Algumas vezes o tratamento é feito utilizando concentrados de vWF.

Os distúrbios de sangramento congênitos menos comuns incluem a deficiência de GPIb-IX (síndrome de Bernard-Soulier), deficiência de GPIIb-IIIa (trombastenia de Glanzmann) e deficiência de fibrinogênio (porque o fibrinogênio faz pontes entre os receptores GPIIb-IIIa de plaquetas adjacentes).

Os distúrbios plaquetários adquiridos incluem baixa contagem de plaquetas (trombocitopenia), o que pode ser resultante da formação defeituosa de plaquetas pelos megacariócitos da medula óssea (como em neoplasia ou aplasia medular) ou da destruição excessiva de plaquetas (p. ex., por anticorpos antiplaquetários ou na esplenomegalia ou na coagulação intravascular disseminada, DIC).



A ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA EXPÕE RECEPTORES GLICOPROTEICOS

As plaquetas podem ser ativadas por vários agentes químicos, incluindo difosfato de adenosina (ADP, liberado pelas plaquetas, eritrócitos e células endoteliais), epinefrina, colágeno, trombina e PAF; por complexos imunes (gerados durante as infecções); e pelo alto estresse físico do cisalhamento (força de cisalhamento é a força tangencial aplicada às células pelo fluxo sanguíneo). Muitos dos agentes químicos parecem agir através da ligação a receptores específicos da membrana superficial das plaquetas. Após o estímulo do receptor, várias vias de ativação plaquetária podem ser iniciadas, resultando em vários fenômenos:

- **mudança na forma das plaquetas** de um disco para uma esfera, com pseudópodos estendidos, o que facilita a agregação e a atividade coagulante

- **liberação de vários compostos envolvidos na hemostasia** provenientes dos grânulos intracelulares, por exemplo: ADP, serotonina, TXA_2 e vWF

- **agregação,** via exposição do receptor de membrana GPIb-IX e ligação pelo vWF (sob altas condições de força de cisalhamento), e via exposição de outro receptor glicoproteico de membrana, GPIIb-IIIa, e ligação pelo fibrinogênio (sob baixas condições de força de cisalhamento)

adesão à parede do vaso por meio da exposição do receptor de membrana GPIb-IX, através do qual o vWF liga as plaquetas ao colágeno subendotelial

Finalmente, o estímulo do receptor de membrana das plaquetas desencadeia a ativação das fosfolipases da membrana que hidrolisam os fosfolipídios de membrana, liberando ácido araquidônico. O ácido araquidônico é metabolizado por ciclo-oxigenase e tromboxano sintase a TXA_2, um potente, porém instável (meia-vida de 30 segundos), mediador da ativação plaquetária e vasoconstrição.

RECEPTORES DE MEMBRANA DE PLAQUETAS E SEUS LIGANTES, vWF E FIBRINOGÊNIO

As plaquetas desempenham um papel-chave na hemostasia e trombose, através da adesão à parede do vaso e subsequente agregação para formar o tampão hemostático rico em plaquetas ou trombo. Esses processos envolvem exposição de receptores glicoproteicos de membrana específicos após a ativação plaquetária por diversos compostos.

O receptor da plaqueta GPIb-IX desempenha papel importante na adesão das plaquetas ao subendotélio. Ele liga o vWF, que também interage com receptores subendoteliais específicos, incluindo aqueles do colágeno subendotelial. As deficiências congênitas de GPIb-IX (síndrome de Bernard-Soulier) ou, mais comumente, de vWF resultam em tendência ao sangramento. Ao contrário, altas concentrações plasmáticas de vWF estão associadas ao risco de trombose. Para pacientes com alto risco de trombose, estratégias terapêuticas contra vWF (por exemplo, anticorpos anti-vWF) estão atualmente sendo desenvolvidas para reduzir o risco de trombose.

Outro receptor, o GPIIb-IIIa, tem papel-chave na agregação plaquetária. Após a ativação das plaquetas, centenas de milhares de receptores GPIIb-IIIa podem ser expostos em uma única plaqueta. Esses receptores interagem com o fibrinogênio ou com o vWF, que ligam as plaquetas umas às outras, formando um tampão trombótico ou hemostático. Uma deficiência congênita no GPIIb-IIIa (a rara trombastenia de Glanzmann) gera um distúrbio de sangramento grave; ao contrário, deficiências tanto no fibrinogênio como no vWF causam um distúrbio de sangramento menos severo, porque esses dois ligantes podem ser substituídos um pelo outro. Altas concentrações plasmáticas de fibrinogênio estão associadas ao aumento do risco de trombose, em parte por causa de sua atividade de ligação à plaqueta. Para pacientes com alto risco de trombose, inibidores do receptor GPIIb-IIIa (como os anticorpos antirreceptor) estão sendo desenvolvidos e sua eficácia clínica está sendo comprovada.

Drogas antiplaquetárias

As drogas antiplaquetárias são utilizadas na prevenção ou no tratamento de trombose arterial: seus locais de ação estão ilustrados na Figura 7.2. Como descrito anteriormente, a Aspirina® inibe a ciclo-oxigenase e, portanto, reduz a formação de TXA_2. Por ela também ter efeito na redução da formação de PGI_2, que por si só possui atividade antiplaquetária, agentes que atuam mais especificamente como inibidores da tromboxano sintase ou como antagonistas do receptor do tromboxano também têm sido investigados como potenciais agentes antiplaquetários, mas não parecem ser mais eficazes do que a Aspirina®. O dipiridamol atua reduzindo a disponibilidade de ADP, a ticlopidina e o clopidogrel inibem o receptor de ADP (Fig. 7.2). Essas drogas têm efeitos antitrombóticos similares aos da Aspirina®, porém causam menos sangramento gástrico porque não interferem na síntese de prostaglandinas no estômago. Os antagonistas de GPIIb-IIIa são utilizados na trombose coronária aguda. Cada uma dessas drogas antiplaquetárias acrescenta eficácia antitrombótica da Aspirina®, mas também aumenta o risco de sangramento quando utilizadas de forma combinada.

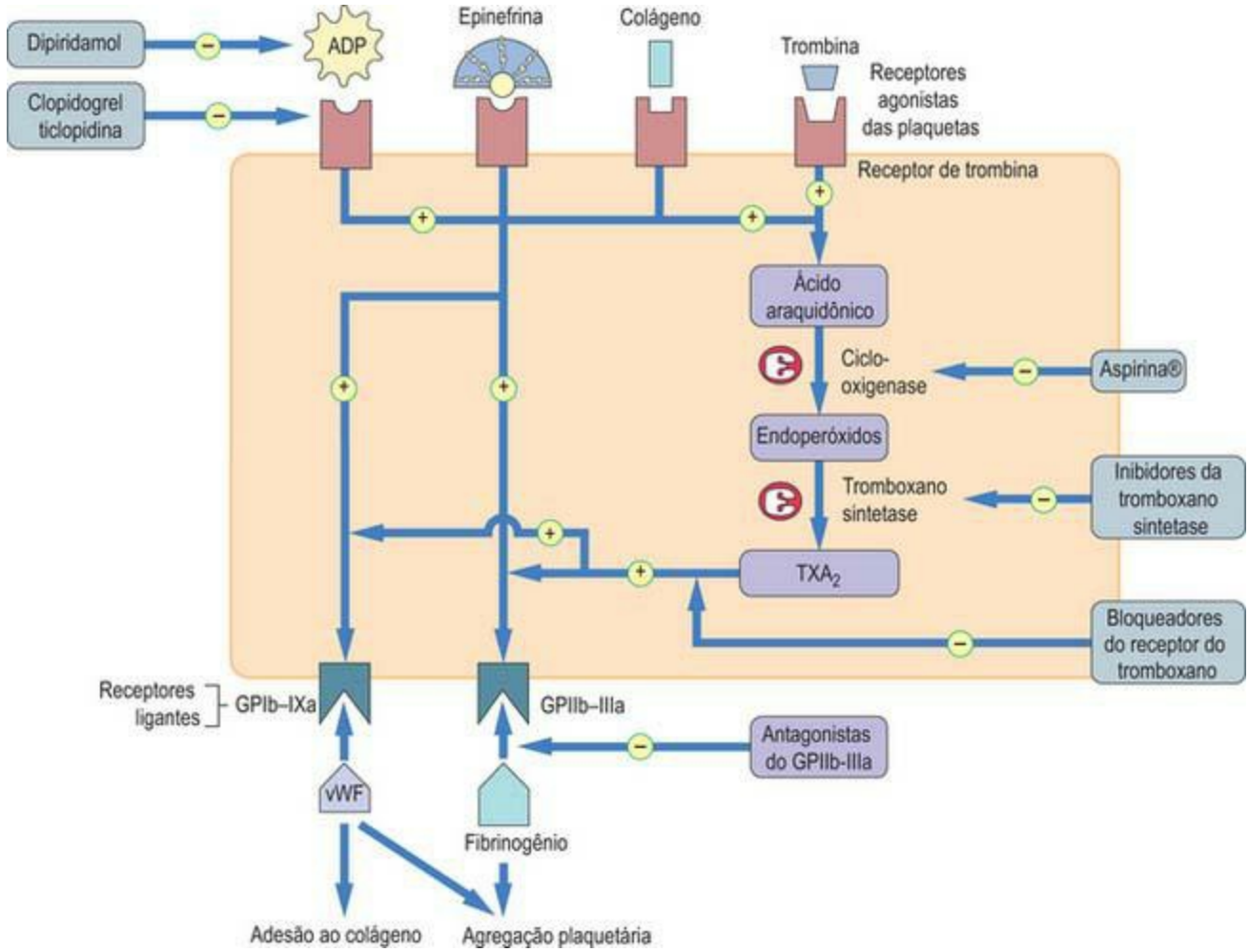


Fig. 7.2 Vias de ativação plaquetária e mecanismos de ação das drogas antiplaquetárias. O estímulo dos receptores agonistas das plaquetas resulta na exposição dos receptores ligantes das plaquetas parcialmente através da via plaqueta-prostaglandina (ciclo-oxigenase). Os receptores ligantes se ligam ao vWF e ao fibrinogênio na adesão/agregação plaquetária. vWF, fator de von Willebrand; TXA_2, tromboxano A_2.

AUTOMONITORAMENTO DO PACIENTE EM TERAPIA ANTICOAGULANTE ORAL

A terapia anticoagulante oral (p. ex., com varfarina) é realizada a longo prazo em pacientes sob risco de trombose no interior das câmaras cardíacas (p. ex., pacientes com fibrilação atrial ou portadores de prótese de válvula cardíaca), que podem embolizar para o cérebro, causando acidente vascular cerebral. O monitoramento do tempo de protrombina a cada poucas semanas é essencial para minimizar o risco, não apenas do tromboembolismo mas também do sangramento excessivo. Até 1% da população adulta nos países desenvolvidos recebe atualmente anticoagulantes orais por longo prazo; portanto, o monitoramento tradicional por médicos e enfermeiras (coletando amostras sanguíneas, enviando-as ao laboratório, analisando os resultados e dando instruções de dosagens aos pacientes) se tornou uma enorme carga de trabalho. Nos últimos anos, foram desenvolvidos aparelhos portáteis para medição do tempo de protrombina, os quais podem ser utilizados por pacientes selecionados para o automonitoramento. Uma amostra de sangue de um "dedo perfurado" é colhida dentro de um tubo capilar, levada para dentro do aparelho, e o resultado é mostrado ao paciente (similar ao automonitoramento da glicose sanguínea por pessoas diabéticas). Algoritmos computadorizados também foram desenvolvidos para registrar os resultados do tempo de protrombina dos pacientes e as doses dos anticoagulantes orais, e podem recomendar mudanças apropriadas da dosagem.

COAGULAÇÃO

Os fatores de coagulação sanguínea interagem para formar o tampão hemostático secundário, rico em fibrina, nos pequenos vasos, e o trombo de fibrina secundário, nas artérias e veias.

Os fatores de coagulação plasmáticos são identificados por algarismos romanos: eles estão listados na Tabela 7.2, juntamente com algumas de suas propriedades. O fator tecidual era antigamente conhecido como fator III, o íon cálcio como fator IV; o fator VI não existe. As deficiências congênitas de outros fatores da coagulação (I-XIII) resultam em sangramento excessivo, o que ilustra sua importância fisiológica na hemostasia. A exceção é a deficiência do fator XII, que não aumenta a tendência ao sangramento, apesar de prolongar os tempos de coagulação sanguínea *in vitro*; o mesmo acontece com seus cofatores, a pré-calicreína ou cininogênio de alto peso molecular (HMWK). Uma possível explicação para isso é apresentada a seguir.

Tabela 7.2 Fatores de coagulação algumas de suas propriedades. n indica o número de subunidades.

Fator	Sinônimo	Peso Molecular (Da)	Concentração plasmática (mg/dL)
I	Fibrinogênio	340.000	200–400
II	Protrombina	70.000	10
III	Fator tecidual (tromboplastina)	44.000	0
IV	*Íon cálcio	40	9–10
V	Pró-acelerina, fator lábil	330.000	1
VII	Acelerador de conversão de protrombina sérica (SPCA), fator estável	48.000	0,05
VIII	Fator anti-hemofílico (AHF)	330.000	0,01
(vWF)		(250.000)n	1
IX	Fator de Christmas	55.000	0,3
X	Fator de Stuart-Prower	59.000	1
XI	Antecedente de tromboplastina plasmática (PTA)	160.000	0,5
XII	Fator de Hageman	80.000	3
XIII	Fator estabilizante de fibrina (FSF)	320. 000	1–2
Pré-calicreína	Fator de Fletcher	85.000	5
Cininogênio de alto peso molecular (HMMK)	Fator de Fitzgerald, Flaujeac ou Williams, cofator de ativação por contato	120.000	6

*Para converter Íon cálcio para mmol/L, multiplique por 0,2495.

A Figura 7.3 ilustra o esquema da coagulação sanguínea atualmente aceito. Desde o início da década de 1960 ele tem sido aceito como uma sequência em "cachoeira" ou "cascata" de conversões interativas de pró-enzimas a enzimas, cada uma das enzimas ativando a próxima pró-enzima em sequência(s). Os fatores enzimáticos ativados são designados pela letra "a", por exemplo: fator XIa. Tradicionalmente, o esquema tem sido dividido em três partes:

- via intrínseca
- via extrínseca
- via final comum

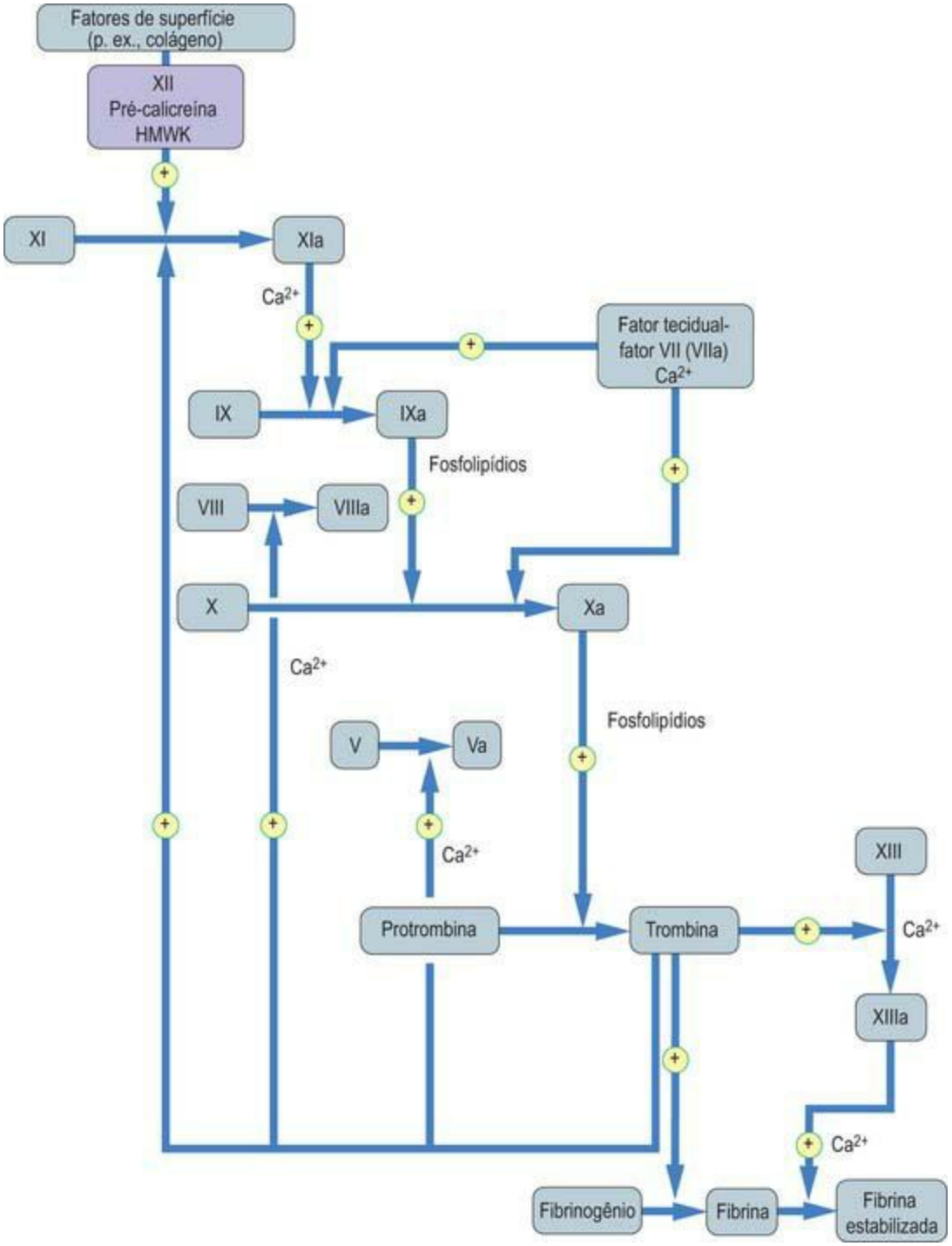


Fig. 7.3 Coagulação sanguínea: ativação dos fatores de coagulação. Após o início da coagulação sanguínea, as pró-enzimas dos fatores de coagulação são ativadas sequencialmente: os fatores enzimáticos ativados são designadas pela letra "a". A caixa roxa indica os fatores de contato, que aparentemente não têm função na hemostasia *in vivo*. Os fosfolipídios são supridos *in vivo* pelas plaquetas. HMWK, cininogênio de alto peso molecular.

Essas vias são descritas a seguir. Elas são distinguidas com base na natureza do fator de iniciação e seu teste correspondente no laboratório de hemostasia clínica; portanto, três testes de coagulação são realizados em laboratórios clínicos em plasma citratado, pobre em plaquetas:

- tempo de tromboplastina parcialmente ativada (APTT)
- tempo de protrombina
- tempo de trombina

O plasma pobre em plaquetas é utilizado nesses testes porque a quantidade de plaquetas influencia nos resultados do tempo de coagulação. Para se obter o plasma pobre em plaquetas o anticoagulante citrato é adicionado ao sangue para sequestrar reversivelmente os íons cálcio, e o sangue é centrifugado a 2.000 g por 15 minutos. Os testes de tempo de coagulação se iniciam pela adição de cálcio e de agentes iniciadores apropriados.

A via intrínseca

O termo “intrínseca” dá a entender que nenhum fator extrínseco, como fator tecidual ou trombina, é adicionado ao sangue além de um contato com uma “superfície’ não endotelial. O teste clínico para essa via é o tempo de tromboplastina parcialmente ativada (APTT), também conhecido como tempo de coagulação caolim-cefalina (KCCT), porque o caolim (argila microparticulada) é adicionado como uma “superfície” padrão e a cefalina (extrato fosfolipídico de cérebro) como um substituto para os fosfolipídios das plaquetas. A faixa normal do APTT é de aproximadamente 30-50 segundos; prolongações desse tempo são observadas nas deficiências dos fatores XII (ou seus cofatores, pré-calicreína ou HMWK), XI, IX (ou seu cofator, fator VIII), X (ou seu cofator, fator V), protrombina (fator II) ou o fibrinogênio (fator I) (Tabela 7.1). O teste é utilizado para excluir as hemofilias congênitas comuns (deficiências dos fatores VIII, IX ou XI; Tabela 7.2) e para monitorar o tratamento com heparina (quadro). As hemofilias causadas por deficiência dos fatores VIII ou IX ocorrem em cerca de um em 10.000 homens; a herança é recessiva ligada ao X, transmitida por mulheres portadoras. O tratamento normalmente consiste em concentrados dos fatores VIII ou IX.

A via extrínseca

O termo "extrínseca' se refere ao efeito do fator tecidual, que (após se combinar com o fator VII da coagulação) acelera bastante a coagulação por ativar tanto o fator IX quanto o fator X (Fig. 7.3). O fator tecidual é um polipeptídio que é expresso em todas as células, exceto as células endoteliais. O teste clínico para essa via é o tempo de protrombina (PT), no qual o fator tecidual é adicionado ao plasma. A faixa normal é de aproximadamente 10-15 segundos; as prolongações desse tempo são observadas em deficiências dos fatores VII, X, V, II ou I. Na prática clínica, o teste é utilizado para diagnosticar tanto os defeitos congênitos raros desses fatores como, muito mais comumente, os distúrbios de sangramento adquiridos, resultantes de:

- **deficiência de vitamina K** (p. ex., má absorção, icterícia obstrutiva; Cap. 11), que reduz a síntese hepática dos fatores II, VII, IX e X. O tratamento é feito com aplicações de injeções de vitamina K

- **anticoagulantes orais** (p. ex., varfarina), que são antagonistas da vitamina K, reduzindo a síntese hepática desses fatores. O sangramento excessivo em pacientes em uso de warfarina pode ser tratado com a interrupção do uso da droga, administrando vitamina K ou repondo os fatores II, VII, IX e X com plasma fresco congelado ou concentrados

- **doença hepática**, que reduz a síntese hepática desses fatores. Por exemplo, o tempo de trombina é um marcador de prognóstico da falência do fígado após *overdose* de acetaminofen (paracetamol) (Cap. 29). O tratamento consiste na reposição dos fatores II, VII, IX e X com plasma fresco congelado ou concentrados

DEFICIÊNCIA DE ANTITROMBINA

Um homem de 40 anos de idade foi admitido na sala de emergência do hospital local devido a uma dor aguda e inchaço na perna esquerda, 10 dias após uma cirurgia importante. As imagens da perna por ultrassom confirmaram a oclusão da veia femoral esquerda por trombo.

Comentário. O paciente foi prescrito com terapia anticoagulante com heparina de baixo peso molecular nas doses padrões. O paciente relatou forte história familiar de "coágulos nas pernas" em idade precoce. Um teste de triagem para a trombofilia foi realizado e mostrou baixo nível de antitrombina no plasma.

HEMOFILIA CLÁSSICA: DEFICIÊNCIA CONGÊNITA DE FATOR VIII

Um menino de 3 anos de idade foi admitido na sala de emergência do hospital local devido a inúmeros hematomas após uma queda de alguns degraus de escada. Um teste de triagem de coagulação de rotina mostrou APPT bastante prolongado, de mais de 150 seg (faixa normal, 30-50 seg.). A análise do fator VIII da coagulação mostrou um nível muito baixo; o nível de vWF foi normal. A mãe do menino relatou história familiar de sangramento excessivo afetando seu irmão e seu pai.

Comentário. Por causa de sua história típica de um distúrbio de sangramento recessivo ligado ao X, nível baixo do fator VIII da coagulação e nível normal de vWF, foi diagnosticado como sendo portador de hemofilia clássica (deficiência congênita do fator VIII). A família foi encaminhada para o centro de hemofilia local e aconselhada a respeito dos riscos de ter outros filhos afetados e filhas portadoras. A criança foi tratada do sangramento atual com concentrado de fator VIII intravenoso, e o mesmo acontecerá em futuros sangramentos, lesões e cirurgias.

A via final comum

A terceira parte da coagulação é testada clinicamente pelo tempo de trombina, no qual trombina exógena é adicionada ao plasma. A faixa normal de valores é de aproximadamente 10-15 segundos; as prolongações desse tempo são observadas na deficiência de fibrinogênio. Ela pode ser congênita, adquirida, devido ao consumo de fibrinogênio na coagulação intravascular disseminada (DIC), ou pode ocorrer após a administração de drogas fibrinolíticas (a seguir). O tratamento é feito com plasma fresco congelado ou concentrados de fibrinogênio.

Trombina

A trombina converte o fibrinogênio circulante em fibrina e ativa o fator XIII, que faz as ligações cruzadas da fibrina formando um coágulo. Acredita-se atualmente que a ativação da coagulação sanguínea seja iniciada normalmente pela lesão vascular, o que causa a exposição do fluxo sanguíneo ao fator tecidual, resultando em ativação dos fatores VII e IX. Posteriormente, a ativação dos fatores X e II (protrombina) ocorre preferencialmente nos locais de lesão vascular e sobre as plaquetas ativadas, que fornecem atividade pró-coagulante (fator plaquetário 3, PF3) como resultado da exposição dos fosfolipídios de superfície da membrana carregados negativamente, tais como a fosfatidilserina. Isso é acompanhado pela exposição, nas plaquetas ativadas, de sítios de ligação de alta afinidade de vários fatores de coagulação ativados (especialmente os fatores Va e VIIIa) e o fornecimento de fosfolipídios das plaquetas, que posteriormente catalisam a ativação da coagulação. Como resultado dessas interações bioquímicas (Figs. 7.1 e 7.4), a formação de trombina e de fibrina é eficientemente localizada nos locais de lesão vascular.

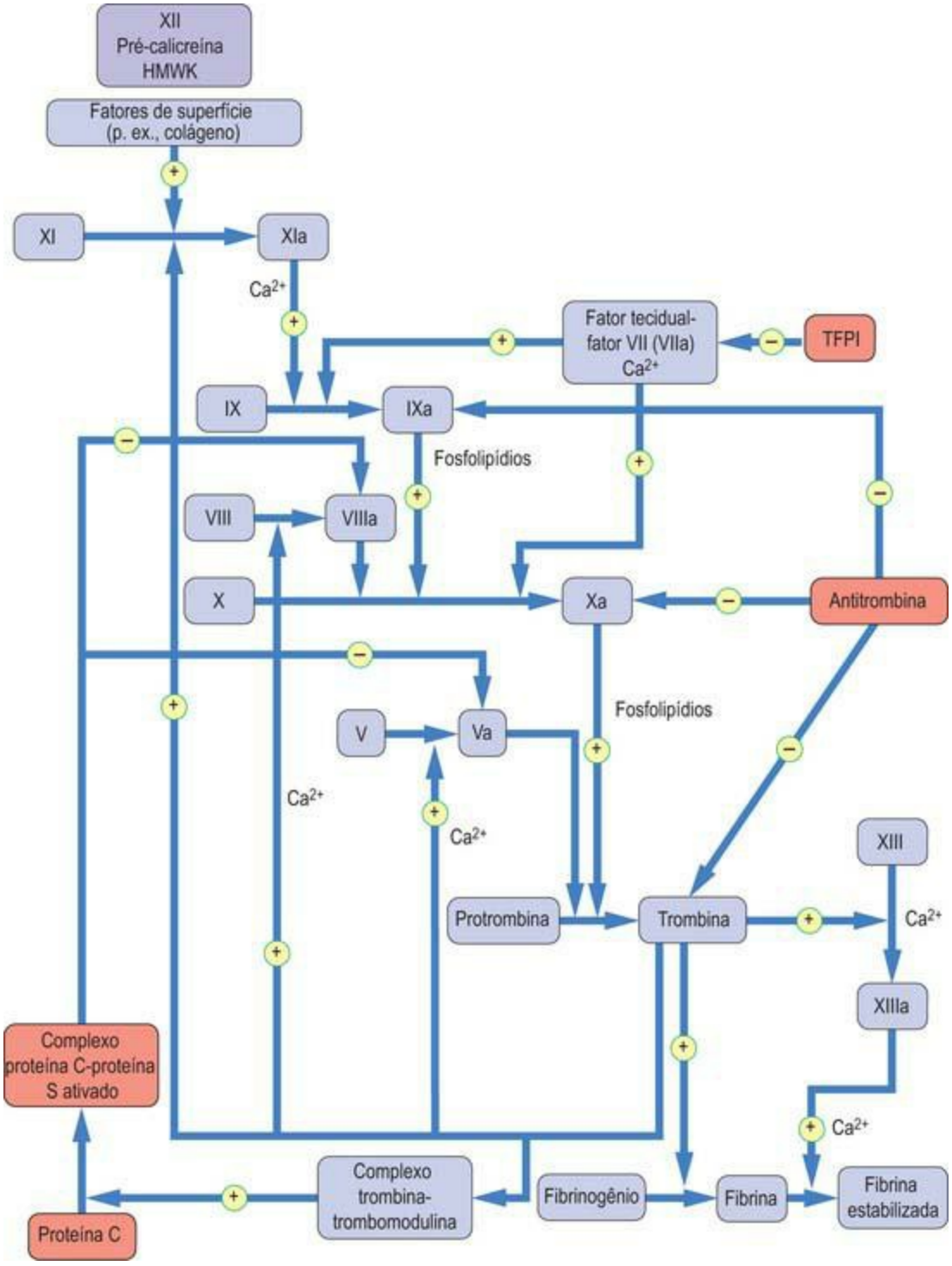


Fig. 7.4 Sítios de ação dos inibidores da coagulação sanguínea. Antitrombina, proteína C e proteína S, e inibidor da via do fator tecidual (TFPI).

A trombina tem um papel central na hemostasia

A trombina não apenas converte o fibrinogênio circulante em fibrina nos locais de lesão vascular, produzindo o tampão hemostático secundário rico em fibrina, mas também ativa o fator XIII (transglutaminase), que faz ligações cruzadas com a fibrina, tornando-a resistente à dispersão pela pressão sanguínea local ou pela fibrinólise (Figs. 7.1 e 7.3). Além disso, a trombina estimula sua própria formação em um ciclo de retroalimentação positivo de duas maneiras:

- **ela catalisa a ativação do fator XI**: isso pode explicar por que as deficiências congênitas de fator XII, pré-calicreína ou HMWK não estão associadas ao sangramento excessivo (Fig. 7.4)

■**ela catalisa a ativação dos fatores VIII e V.**

A trombina também ativa as plaquetas (Fig. 7.2).

Agora que o papel central da trombina na hemostasia e trombose foi reconhecido, existe atualmente interesse no desenvolvimento de antitrombinas diretas como drogas antitrombóticas; estas incluem exemplos como a hirudina (originalmente obtida de sanguessugas medicinais, *Hirudo medicinalis*) e seus derivados sintéticos.

Os inibidores da coagulação são essenciais para a prevenção da formação excessiva de trombina e da trombose

Foram identificados três sistemas inibidores da coagulação (Fig. 7.4 e Tabela 7.3).

Tabela 7.3 Propriedades dos inibidores da coagulação.

Propriedades dos inibidores da coagulação		
Inibidor (sinônimo)	**Peso molecular**	**Concentração plasmática (mg/dL)**
Antitrombina (antitrombina III)	65.000	18-30
Proteína C	56.000	0,4
Proteína S	69.000	2,5
Inibidor da via do fator tecidual, TFPI (inibidor da coagulação associado à lipoproteína, LACI)	32.000	0,1

■**Antitrombina**: essa é uma proteína sintetizada no fígado. Sua atividade é catalisada pela droga

antitrombótica heparina e pelas glicosaminoglicanas endógenas semelhantes à heparina (GAGs) que estão presentes na superfície das células endoteliais vasculares. Ela não inativa apenas a trombina, mas também os fatores IXa e Xa (Fig. 7.4). A deficiência congênita de antitrombina resulta no aumento do risco de tromboembolismo venoso. Injeções de heparina são administradas no tratamento de trombose venosa ou arterial aguda; normalmente elas são substituídas pelo uso de anticoagulantes orais, tais como a varfarina, para a anticoagulação a longo prazo.

- **Proteína C e seu cofator, proteína S**: essas são proteínas dependentes de vitamina K, sintetizadas no fígado. Quando a trombina é formada, ela se liga à trombomodulina (peso molecular 74 kDa) que está presente na superfície das células endoteliais vasculares. O complexo trombina-trombomodulina ativa a proteína C, que forma um complexo com o seu cofator, a proteína S. Esse complexo degrada seletivamente os fatores Va e VIIIa através de proteólise limitada (Fig. 7.4). Portanto, essa via forma uma retroalimentação negativa na geração de trombina. Deficiências congênitas de proteína C ou proteína S resultam em um risco maior de tromboembolismo venoso; uma outra causa de aumento do risco de tromboembolismo venoso é uma mutação no fator V da coagulação (fator V de Leiden), que confere resistência à sua inativação pela proteína C ativada. Essa mutação é comum, ocorrendo em aproximadamente 3% da população nos países ocidentais.

- **Inibidor da via do fator tecidual (TFPI)**: essa proteína é sintetizada no endotélio e no fígado; circula ligada a lipoproteínas. Ela inibe o complexo fator tecidual VIIa (Fig. 7.4), o que pode explicar o grave sangramento nas hemofilias causadas por deficiência dos fatores VIII ou IX (falha em manter a formação de trombina e fibrina). Ao contrário, a deficiência de TFPI não parece aumentar o risco de trombose.



MEDIÇÃO DOS DÍMEROS D DE FIBRINA NO DIAGNóSTICO DE SUSPEITA DE TROMBOSE VENOSA PROFUNDA

Os dímeros D de fibrina (um produto de degradação da fibrina com ligações cruzadas e um marcador de renovação de fibrina) estão presentes no sangue normalmente em concentrações menores que 0,25 mg/L. Na trombose venosa profunda da perna (DVT), a deposição de uma grande massa de fibrina com ligações cruzadas no interior das veias da perna, seguida de lise parcial pelo sistema fibrinolítico do corpo, aumenta a renovação de fibrina, e os níveis de dímeros D no sangue se mostram elevados. Muitos pacientes são atendidos nos serviços de emergência com a perna inchada e/ou dolorida, o que pode ser devido à DVT. Imunoensaios rápidos para a detecção de dímeros D no sangue podem ser realizados no serviço de emergência e são agora amplamente utilizados como complemento do diagnóstico clínico. Aproximadamente um terço dos pacientes com suspeita clínica de DVT apresenta níveis normais de dímeros D, o que, em combinação com uma baixa pontuação clínica, normalmente exclui o diagnóstico e pode permitir a dispensa rápida desses pacientes sem a necessidade de investigação adicional ou tratamento. Em pacientes com níveis elevados de dímeros D, o tratamento com heparina é iniciado, e um exame de imagem da perna é realizado (normalmente por ultrassom) para confirmar a presença e a extensão da DVT.

FIBRINÓLISE

O sistema fibrinolítico também limita a formação excessiva de fibrina

O sistema de coagulação atua para formar a fibrina; o sistema fibrinolítico atua para limitar a formação excessiva de fibrina (tanto intra como extravascular) através de fibrinólise mediada por plasmina. O plasminogênio circulante se liga à fibrina via sítios de ligação à lisina; ele é convertido em plasmina ativa por ativadores do plasminogênio. O ativador do plasminogênio tecidual (tPA) é sintetizado por células endoteliais; ele normalmente circula no plasma em concentrações basais baixas (5 ng/mL), porém é liberado no plasma por estímulos que incluem oclusão venosa, exercícios e epinefrina. Junto com o plasminogênio, liga-se fortemente à fibrina, o que estimula sua atividade (o K_m para o plasminogênio diminui de 65 para 0,15 μ mol/L na presença de fibrina), direcionando, assim, a atividade da plasmina para os depósitos de fibrina. A atividade excessiva de tPA no plasma é normalmente prevenida por um excesso do seu principal inibidor, o inibidor 1 do ativador do plasminogênio (PAI-1), que é sintetizado tanto por células endoteliais como pelos hepatócitos. O ativador de plasminogênio urinário (uPA) circula no plasma tanto na forma precursora de cadeia simples ativa (scuPA, pró-uroquinase) quanto na forma de cadeia dupla mais ativa (tcuPA, uroquinase). Um ativador da scuPA é o fator XII da coagulação ativado na superfície que, portanto, liga os sistemas de coagulação e fibrinolítico. Os principais componentes do sistema fibrinolítico estão ilustrados na Tabela 7.4 e na Figura 7.5.

Tabela 7.4 Propriedades dos componentes do sistema fibrinolitico.

Propriedades dos componentes do sistema fibrinolitico

Componente (sinônimo)	Peso molecular	Concentração plasmática (mg/dL)
Plasminogênio	92.000	0.2
Ativador de plasminogênio, tPA	65.000	5 (basal)
Ativador de plasminogênio urinário, uPA	54.000	20
Inibidor 1 do ativador de plasminogênio, PAI-1	48.000	200
Antiplasmina(a_2 antiplasmina)	70.000	700

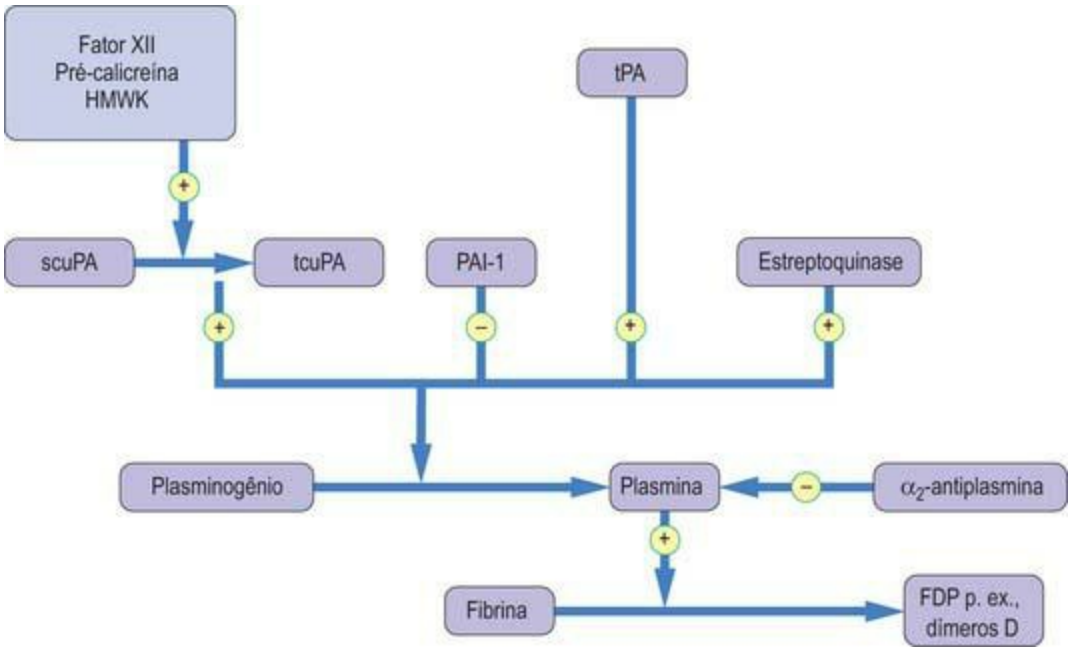


Fig. 7.5 O sistema fibrinolítico. O plasminogênio pode ser ativado à plasmina pela uPA (uroquinase), pelo tPA ou pela estreptoquinase. A uPA e o tPA são inibidos pelo inibidor 1 do ativador de plasminogênio (PAI-1). A plasmina é inibida pela antiplasmina. A plasmina degrada a fibrina em produtos de degradação da fibrina (FDP). HMWK, cininogênio de alto peso molecular; scuPA, pró-uroquinase; tcuPA, uroquinase; tPA, ativador do plasminogênio tecidual.

A formação excessiva de plasmina normalmente é prevenida por:

- ligação de 50% de plasminogênio à glicoproteína rica em histidina (HRG)
- rápida inativação de plasmina livre por seu principal inibidor, a α_2-antiplasmina

A importância fisiológica do PAI-1 e da α_2-antiplasmina é ilustrada pelo aumento da tendência ao sangramento que está associado aos casos raros de suas deficiências congênitas (Tabela 7.1); a atividade excessiva de plasmina no plasma, resultante das deficiências, tem o efeito de lisar os tampões hemostáticos.

TRATAMENTO ANTITROMBÓTICO DO INFARTO DO MIOCÁRDIO

A oclusão da artéria coronária por trombo causa a morte daquela parte do músculo cardíaco que é suprida pela artéria (infarto do miocárdio). No infarto agudo do miocárdio, o paciente tipicamente experimenta uma dor substancialmente forte no peito.

Aspirina® e heparina são também normalmente administradas no infarto agudo do miocárdio e outras síndromes coronárias agudas para inibir os componentes da plaqueta e da fibrina no trombo em desenvolvimento na artéria coronária.

Muitos pacientes com evolução de infarto agudo do miocárdio foram candidatos ao tratamento trombolítico com uma droga ativadora de plasminogênio administrada por via intravenosa. Prontamente a trombólise dissolveu o trombo na artéria coronária, reduziu o tamanho do infarto e o risco de complicações, incluindo óbito e falência cardíaca. Entretanto, nos últimos anos, a remoção direta do trombo (intervenção coronária percutânea) é realizada em vez da terapia trombolítica, porque, ao contrário da terapia trombolítica, ela não aumenta o risco de sangramento, por exemplo, no cérebro.

Comentário. As drogas trombolíticas são também utilizadas em alguns pacientes cuidadosamente selecionados, com evolução precoce de acidente vascular cerebral isquêmico ou em alguns pacientes com embolia pulmonar massiva. As drogas trombolíticas incluem ativadores de plasminogênio tecidual e urinário (tPA e uPA) (Fig. 7.5), produzidos por tecnologia do DNA recombinante ou suas variantes sintéticas. Todas as drogas trombolíticas podem causar sangramento (Tabela 7.1) como resultado da lise dos tampões hemostáticos além dos trombos-alvo.

Resumo

- A hemostasia é constituída de vários processos que protegem o corpo contra a perda de sangue.

- A lesão da parede do vaso sanguíneo estabelece um fenômeno dinâmico complexo que envolve as plaquetas sanguíneas (ativação, adesão, agregação) e uma cascata de fatores de coagulação, classificada como vias intrínseca, extrínseca e final comum.

- A integridade desses três sistemas pode ser avaliada por testes laboratoriais simples.

- Deficiências dos fatores que participam da cascata de coagulação e/ou função inadequada das plaquetas resultam em distúrbios de sangramento.

- Eventualmente os coágulos sanguíneos são degradados pelo sistema fibrinolítico. O processo de fibrinólise impede os fenômenos trombóticos e existe normalmente um equilíbrio entre hemostasia e trombose.

- A Aspirina ® e a heparina são utilizadas em pacientes com infarto agudo do miocárdio ou outras síndromes coronárias agudas.

- A Aspirina ® (ou outro agente antiplaquetário) é também utilizada para reduzir o risco de recorrência de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral.

- As drogas anticoagulantes (p. ex., heparina e depois varfarina) são utilizadas no tratamento de trombose venosa aguda ou embolia.

- As drogas anticoagulantes (p. ex., varfarina) são utilizadas, a longo prazo, para prevenir o tromboembolismo do coração (fibrilação atrial, próteses de válvulas cardíacas).

QUESTÕES DE APRENDIZADO

Teste seus conhecimentos

1. Quando um paciente apresenta sangramento excessivo em múltiplos locais, que testes laboratoriais devem ser realizados para identificar a causa provável de seu defeito hemostático?

2. Quando um paciente apresenta a perna inchada e dolorida, possivelmente devido a trombose venosa profunda aguda (DVT), que testes laboratoriais podem ser realizados para ajudar o clínico a:
 - estabelecer ou excluir esse diagnóstico?
 - monitorar o tratamento com anticoagulante após confirmação do diagnóstico?

3. Quando um paciente apresenta trombose coronária aguda (evoluindo para o infarto do miocárdio), que drogas antitrombóticas deveriam ser urgentemente consideradas para reduzir o risco de complicações?

Leituras sugeridas

de Moerloose P, editor. State of the art 2007. J Thromb Haemostas. 2007;55;suppl 1:1-331.

Mannucci PM, Levi M. Prevention and treatment of major blood loss. *N Engl J Med*. 2007;356:2301-2311.

Marsh N, editor. State of the art 2005. J Thromb Haemostas. 2005;3;8:1553-1904.

Membranas e Transporte

M. Maeda

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever as diferenças entre os sistemas de transporte passivo e ativo mediado por carreador.
- Descrever as características básicas dos canais e poros de membrana.
- Dar vários exemplos específicos de sistemas de transporte de íons e substrato, incluindo sistemas acoplados de transporte.
- Descrever várias doenças características resultantes de defeitos no transporte de membrana.

INTRODUÇÃ

Como discutido no capítulo 3, as biomembranas não são rígidas ou impermeáveis, mas estruturas altamente móveis e dinâmicas. A membrana plasmática é o porteiro da célula. Ela controla não somente o acesso de íons inorgânicos, vitaminas e nutrientes, mas também a entrada de fármacos e a saída de produtos da eliminação. As proteínas integrais transmembrana têm papéis importantes no transporte dessas moléculas através da membrana e frequentemente mantêm os gradientes de concentração através das membranas. As concentrações de K^+, Na^+ e Ca^{2+} no citoplasma são mantidas em ~140, 10 e 10^{-4} mmol/L (546, 23 e 0,0007 mg/dL), respectivamente, pelas proteínas transportadoras, enquanto aquelas do lado extracelular (no sangue) são ~5, 145 e 1-2 mmol/L (20, 333 e 7-14 mg/dL), respectivamente. A força de direcionamento para o transporte dos íons e a manutenção dos gradientes iônicos é fornecida direta ou indiretamente pelo ATP. As propriedades transportadoras da membrana serão ilustradas por vários exemplos importantes.

TIPOS DE PROCESSOS DE TRANSPORTE

Difusão simples através da bicamada fosfolipídica

Pequenas moléculas não polares (tais como O_2, CO_2, N_2) e moléculas polares não carregadas (tais como ureia, etanol e pequenos ácidos orgânicos) se movem através das membranas por difusão simples sem o auxílio das proteínas de membrana (Tabela 8.1 e Fig. 8.1A). A direção do movimento dessas espécies sempre é "descendente", ao longo do gradiente de concentração, do mais concentrado para o menos concentrado, e assim estabelece o equilíbrio.

Tabela 8.1 Classificação dos sistemas de transporte das biomembranas. Os sistemas de transporte são classifi cados de acordo com o papel das proteí-nas de transporte e gasto de energia. Substratos típicos para vários tipos de canais são mostrados em parênteses.

Tipo		Proteína de transporte (exemplo)	Gasto de energia	Especificidade	Saturabilidade	Taxa (moléculas/ proteínas transportadas)
Transporte passivo ou difusão	Difusão simples	–	–	–	–	
	Difusão facilitada	+	–	+	+	
	transportador	(GLUT-1–5)				~10^2
	canal	(H_2O, Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^-)				10^7–10^8
Transporte ativo	Primário	+	+	+	+	10^2–10^4
	Secundário	+	+	+	+	10^0–10^{2*}
	Simporte	(SGLT-1, 2, aminoácidos neutros)				
	Antiporte	(Cl^-, HCO_3^-, Na^+/Ca^{2+}, Na^+/H^+)				
	Uniporte	(glutamato)				

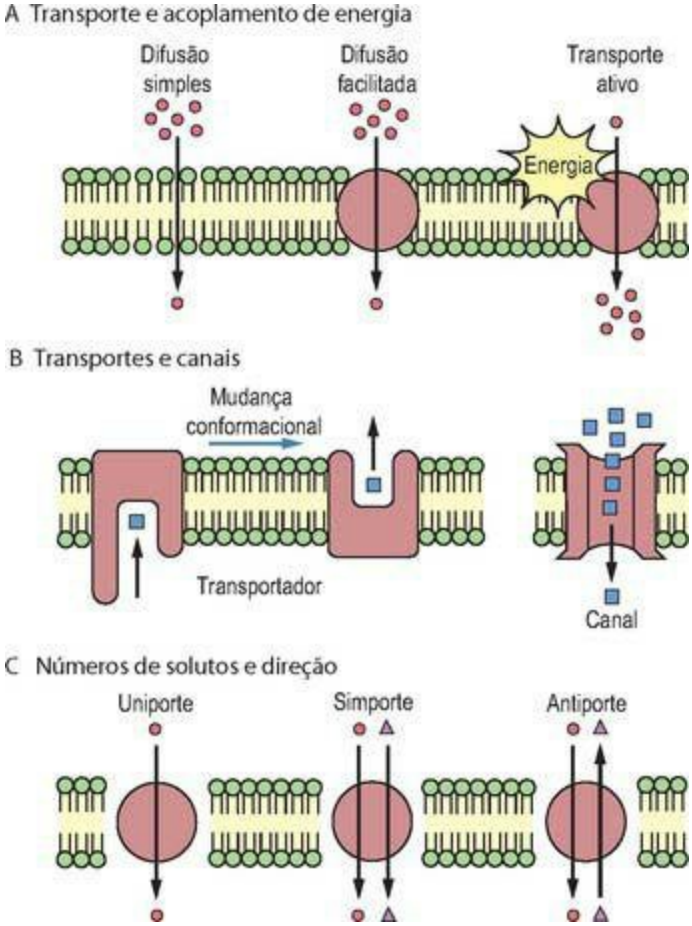


Fig. 8.1 Vários modelos de movimento de soluto através das membranas.

A hidrofobicidade das moléculas é uma importante condição para que ocorra a difusão simples através da membrana porque o interior da bicamada lipídica é hidrofóbico. A taxa de transporte dessas moléculas é, de fato, intimamente relacionada com seus coeficientes de partição entre óleo e água.

Embora moléculas de água possam ser transportadas por difusão simples, acredita-se que as proteínas-canal (ver adiante) controlem o movimento de água através da maioria das membranas, especialmente nos rins para a concentração da urina. Uma mutação no gene da proteína-canal de água (aquaporina-2) causa diurese em alguns pacientes com diabetes insipidus nefrogênico, uma doença caracterizada por urina excessiva, mas sem a hiperglicemia característica do diabetes melito (Cap. 23).

Transporte mediado por proteínas de membrana

O transporte de grandes moléculas polares, tais como aminoácidos ou açúcares, para dentro da célula, necessita do envolvimento de proteínas de membrana conhecidas como transportadoras, também chamadas portadoras, permeases, translocases ou proteínas carreadoras. O termo "carreador" também é aplicado aos ionóforos, os quais se movem passivamente através da membrana junto com íon ligado (Fig. 8.2). Os transportadores são tão específicos quanto as enzimas o são para os substratos, e trabalham por um de dois mecanismos: difusão facilitada ou transporte ativo. A difusão facilitada catalisa o movimento de um substrato através da membrana a favor de um gradiente de concentração e não necessita de energia. Ao contrário, o transporte ativo é um processo no qual os substratos são transportados para cima, contra seu gradiente de concentração. O transporte ativo tem de ser acoplado a uma reação com produção de energia (Fig. 8.1A).

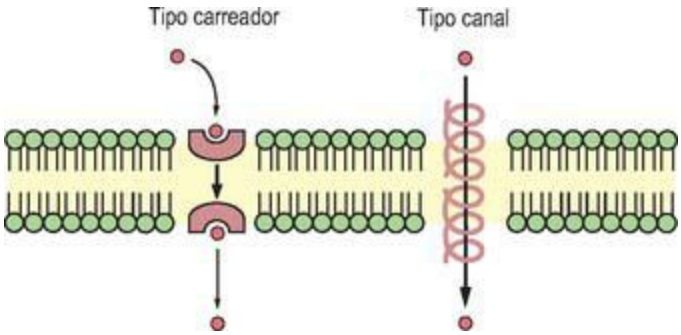


Fig. 8.2 Carreadores iônicos móveis e ionóforos formadores de canal. Os ionóforos permitem movimento de íons somente a favor de seus gradientes eletroquímicos.

PERMEABILIDADE DA MEMBRANA

Antibióticos que induzem a permeabilidade de íons

Antibióticos peptídicos agem como ionóforos e aumentam a permeabilidade das membranas a íons específicos; os efeitos bactericidas dos ionóforos são atribuídos a distúrbio dos sistemas de transporte iônicos da membrana bacteriana. Os ionóforos permitem o movimento de íons somente a favor de seus gradientes eletroquímicos. Existem duas classes de ionóforos: carreadores iônicos móveis (carreadores aprisionados) e formadores de canais (Fig. 8.2). A valinomicina é um exemplo típico de carreador iônico móvel. é um peptídeo cíclico com exterior lipofílico e interior iônico. Ela se dissolve na membrana e se difunde entre as superfícies interna e externa. O K^+ se liga no núcleo central da valinomicina, e o complexo se difunde pela membrana, liberando o K^+ e gradualmente dissipando o gradiente de K^+. O carreador tipo ionóforo, nigericina e monensina, troca H^+ por Na^+ e K^+, respectivamente. A ionomicina e o A23187 são ionóforos de Ca^{2+}.

A molécula A da β-hélice da gramicidina, um peptídeo linear com 15 resíduos de aminoácidos, forma um poro. O dímero cabeça a cabeça da gramicidina A forma um canal transmembrana que

permite o movimento de cátions monovalentes (H^+, Na^+ e K^+).

Os antibióticos poliênicos como a anfotericina B e a nistatina exercem sua ação citotóxica por tornar a membrana da célula-alvo permeável aos íons e às pequenas moléculas. A formação de complexo esterol-polieno é essencial para a função citotóxica desses antibióticos, já que eles exibem ação seletiva contra organismos nos quais as membranas contêm esteróis. Então, eles são ativos contra leveduras, grande variedade de fungos e outras células eucarióticas, mas não têm efeito em bactérias. Por causa de sua afinidade pelo ergosterol, um componente da membrana dos fungos, ser maior do que pelo colesterol, esses antibióticos têm sido usados para o tratamento de infecções tópicas de origem fúngica.

Saturabilidade e especificidade são características importantes dos sistemas de transporte de membrana

A taxa da difusão facilitada geralmente é muito maior do que a da difusão simples: as proteínas de transporte catalisam o processo de transporte. Ao contrário da difusão simples, na qual a taxa de transporte é diretamente proporcional à concentração do substrato, a difusão facilitada é um processo saturável, tendo uma taxa de transporte máximo, $T_{máx}$ (Fig. 8.3). Quando a concentração das moléculas extracelulares (substratos de transporte) se torna muito alta, o $T_{máx}$ é alcançado pela saturação das proteínas de transporte com o substrato. A cinética da difusão facilitada para os substratos pode ser descrita pelas mesmas equações que são usadas para a catálise de enzimas (p. ex., equações do tipo Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk) (Cap. 6):

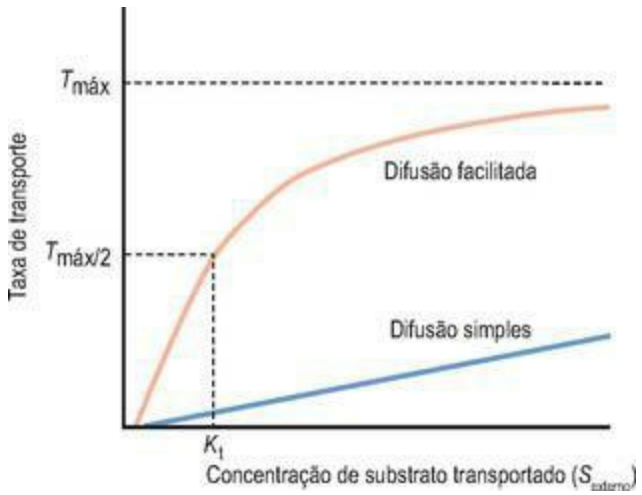


Fig. 8.3 Comparação das cinéticas de transporte da difusão facilitada e da difusão simples. A taxa de transporte do substrato é plotada contra a concentração de substrato no meio extracelular. Em comum com a catálise enzimática, a absorção catalisada por transportados tem uma taxa de transporte máximo, $T_{máx}$ (saturável). K_t é a concentração na qual a taxa de absorção do substrato é metade da máxima. Para a difusão simples, a taxa de transporte é mais lenta e diretamente proporcional à concentração do substrato.

$$S_{externo} + \text{transportador} \underset{}{\overset{K_t}{\rightleftharpoons}} (S\bullet\text{complexo transportador}) \rightarrow S_{interno}$$

onde K_t é a constante de dissociação do complexo substrato-transportador e $S_{externo}$ é a concentração do substrato transportado. Então, a taxa de transporte, t, pode ser calculada como:

$$t = \frac{T_{max}}{\left[1 + \frac{K_t}{S_{out}}\right]}$$

onde o K_t é a concentração que dá a metade da taxa de transporte máxima. O K_t para um transportador conceitualmente é o mesmo que para o K_m para uma enzima.

O processo de transporte com frequência altamente específico: cada transportador transporta somente uma única espécie de moléculas ou compostos estruturalmente relacionados. O transportador GLUT-1 das células vermelhas sanguíneas tem alta afinidade pela D-glicose, mas uma afinidade 10-20 vezes menor para os açúcares relacionados, D-manose e D-galactose. O enantiômero L-glicose não é transportado; seu K_t é mais do que 1.000 vezes maior do que o da forma D.

CISTINOSE

Uma criança de 18 meses de idade apresentou poliúria, falha no crescimento e um episódio de desidratação severa. O teste de urina apresentou glicosúria e proteinúria, com outras análises bioquímicas mostrarando aminoacidúria generalizada e fosfatúria.

Comentário. Essa é uma apresentação clássica de cistinose infantil, resultante de acúmulo de cistina nos lisossomas por causa de defeito na proteína de transporte lisossomal, cistinosina. A cistina é fracamente solúvel, e um precipitado cristalino se forma nas células por todo o corpo. Experimentos *in vitro* com carga de cistina mostraram que as células do túbulo proximal renal se tornam depletadas de ATP, resultando em lesão das bombas de íons dependentes de ATP com consequente desbalanço de eletrólitos e perda de metabólitos. O tratamento com cisteamina aumenta o transporte de cistina dos lisossomas, retardando o declínio na função renal. A cisteamina é uma base fraca; ela forma um dissulfeto misto com a cisteína, o qual é então secretado através de um transportador catiônico de aminoácidos. Se não tratada, a falência renal ocorre entre 6-12 anos de idade. Lamentavelmente, existe mais acúmulo de cistina no sistema nervoso central, apesar da terapia, com dano neurológico a longo prazo.

DOENÇA DE HARTNUP

Um menino de três anos de idade passou o feriado na Espanha e desenvolveu erupções de pele do tipo pelagra na face, pescoço, antebraços e porção dorsal das mãos e pernas. Sua pele se tornou escamosa, áspera e hiperpigmentada. A criança foi levada ao GP reclamando de dores de cabeça e fraqueza. A urinálise demonstrou maciça hiperaminoacidúria de ácidos monoamino-monocarboxílicos neutros (p. ex., alanina, serina, treonina, asparagina, glutamina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina e citrulina).

Comentário. Esses aminoácidos neutros compartilham um transportador comum, o qual é expresso somente na borda luminal das células epiteliais nos túbulos renais e epitélio intestinal. A dermatite do tipo pelagra (Cap. 11) e o envolvimento neurológico se parecem com a deficiência nutricional de niacina. A ingestão reduzida de triptofano resulta em produção reduzida de nicotinamida. A doença é facilmente tratada com nicotinamida oral e aplicação de protetor solar nas

áreas expostas.

Características dos transportadores de glicose (uniportes)

Os transportadores de glicose são essenciais para a difusão facilitada de glicose para dentro das células. A família GLUT de transportadores de glicose inclui do GLUT-1 ao GLUT-5 (Tabela 8.2) e outros. Elas são proteínas transmembrana similares em tamanho, todas tendo cerca de 500 resíduos de aminoácidos e 12 hélices transmembrana. O GLUT-1, nas células vermelhas sanguíneas, tem o K_m de ~2 mmol/L. O transportador GLUT-1 opera em cerca de 40% do $T_{máx}$ sob condições de jejum (concentração de glicose de 5 mmol/L; 90 mg/dL); esse nível de atividade é suficiente para alcançar as necessidades das células vermelhas (Cap. 12). Em contraste, as células β das ilhotas pancreáticas, expressam GLUT-2, com K_m maior do que 10 mmol/L (180 mg/dL). Em resposta à ingestão de alimento e ao aumento resultante na concentração de glicose sanguínea, as moléculas de GLUT-2 respondem aumentando a entrada de glicose nas células β, estimulando a secreção de insulina (Cap. 21). As células nos tecidos sensíveis à insulina, como músculo e o tecido adiposo, têm o GLUT-4. A insulina estimula a translocação do GLUT-4 das vesículas intracelulares para a membrana plasmática, facilitando a entrada de glicose durante as refeições.

Tabela 8.2 Classificação dos transportadores de glicose. Valores de K_m são determinados a partir da entrada de 2-deoxi-D-glicose (*), um análogo não metabolizável da glicose e frutose (**).

Transportador	K_t para transporte de D-glicose (mM)	Substrato	Principais sítios de expressão
Difusão facilitada (uniporte) (transporte passivo)			
GLUT-1	1–2	Glicose, galactose, manose	Eritrócito, barreiras sangue-tecido
GLUT-2	15–20	Glicose, frutose	Fígado, intestino, rins, células β pancreáticas, cérebro
GLUT-3	1,8*	Glicose	Ubíquo
GLUT-4	5	Glicose	Músculos esquelético e cardíaco, tecidos adiposos
GLUT-5	6–11**	Frutose	Intestino
Simporte acoplado a Na^+ (transporte ativo)			
SGLT-1	0,35	Glicose ($2Na^+$/1 glicose), galactose	Intestino, rins
SGLT-2	1,6	Glicose ($1Na^+$/1 glicose	Rins

TRANSPORTE DEFEITUOSO DE GLICOSE ATRAVÉS DA BARREIRA

HEMATOENCEFÁLICA COMO CAUSA DE CONVULSÕES E DESENVOLVIMENTO RETARDADO

Uma criança do sexo masculino de três meses de idade sofreu convulsões recorrentes. As concentrações de glicose no líquido cefalorraquidiano (LCR) estavam baixas (0,9-1,9 mmol/L, 16-34 mg/dL) e a proporção de glicose do LCR para o sangue variava de 0,19 a 0,33, sendo que o valor normal é de 0,65. As causas potenciais das baixas concentrações de glicose no LCR, tais como meningite bacteriana, hemorragia subaracnoide e hipoglicemia, não estavam presentes, e altos valores de lactato no LCR podiam ser encontrados em todas essas condições, exceto na hipoglicemia. Em contraste, as concentrações de lactato no LCR foram consistentemente baixas (0,3-0,4 mmol/L; 3-4 mg/dL) quando comparadas com o valor normal (~2,2 mmol/L; ~20mg/dL). Esses achados sugerem um defeito no transporte de glicose do sangue para o cérebro.

Comentário. Assumindo que a atividade do transportador de glicose GLUT-1 nos eritrócitos reflete aquela nos microvasos do cérebro, um ensaio de transporte foi realizado usando seus eritrócitos. O $T_{máx}$ para a entrada de glicose nos eritrócitos do paciente foi 60% do valor normal médio, sugerindo defeito heterozigoto. Uma dieta cetogênica (dieta rica em gordura, pobre em proteína e carboidratos) foi iniciada, já que o cérebro pode usar os corpos cetônicos como fonte de combustível oxidável, e a entrada de corpos cetônicos para dentro do cérebro não é dependente do sistema de transporte de glicose. O paciente parou de ter convulsões dentro de quatro dias após o início da dieta.

Transporte por canais e poros

Os canais frequentemente são descritos como túneis através da membrana nos quais os sítios de ligação para os substratos (íons) são acessíveis de qualquer dos lados da membrana ao mesmo tempo (Fig. 8.1B). Mudanças conformacionais não são necessárias para a translocação dos substratos entrando por um lado da membrana para sair pelo outro lado. Entretanto, mudanças na voltagem e na ligação do ligante induzem mudanças conformacionais na estrutura do canal que têm o efeito de abertura ou fechamento dos canais — processos conhecidos como dependentes de voltagem ou de ligante (*gating*). O movimento de moléculas através dos canais é rápido em comparação com as taxas alcançadas pelos transportadores (Tabela 8.1).

Os termos "canais" e "poros" são usados algumas vezes alternadamente. Entretanto, "poro" é usado mais frequentemente para descrever estruturas mais abertas, estruturas não seletivas que discriminam entre substratos, p. ex. peptídeos ou proteínas, com base no tamanho. O termo "canal" é usualmente aplicado para canais iônicos mais específicos.

Três exemplos de poros importantes para a fisiologia celular

A junção comunicante (*gap*) entre as células endoteliais, musculares e neuronais é um grupo de pequenos poros, nos quais dois cilindros de seis subunidades de conexinas na membrana plasmática se juntam uns aos outros para formar um poro de cerca de 1,2-2,0 mm (12-20 Å) de diâmetro. Moléculas menores do que cerca de 1 kDa podem passar entre as células através dessas junções comunicantes. Tal intercâmbio célula-célula é importante para a comunicação ou acoplamento fisiológico, por exemplo, na contração combinada do músculo uterino durante o trabalho de parto. Mutações nos genes que codificam para a conexina 26 e conexina 32 causam surdez e doença de Charcot-Marie-Tooth, respectivamente.

Os poros nucleares têm raio de cerca de 9,0 nm (90 Å) através do qual grandes proteínas e ácidos nucleicos entram e saem do núcleo.

Uma terceira classe de poros é importante para o direcionamento de proteínas. Proteínas mitocondriais codificadas por genes nucleares são transportadas para essa organela através de poros na membrana mitocondrial externa. Cadeias de polipeptídeos nascentes de proteínas secretórias e proteínas da membrana plasmática também passam através dos poros da membrana do retículo endoplasmático durante a biossíntese da cadeia peptídica.

Transporte ativo

O ATP é um produto do metabolismo de alta energia e frequentemente é descrito como "energia utilizável" da célula (Cap. 9). A ligação fosfoanidrido do ATP libera energia livre quando é hidrolisada para produzir difosfato de adenosina (ADP) e fosfato inorgânico. Tal energia é usada para a síntese de pequenas e grandes moléculas celulares, movimento celular e transporte ascendente de moléculas contra gradientes de concentração. Os sistemas primários de transporte ativo usam ATP diretamente para dirigir o transporte; o transporte ativo secundário usa um gradiente eletroquímico de íons Na^+ ou H^+, ou um potencial de membrana produzido pelos processos de transporte ativo primários. Açúcares e aminoácidos geralmente são transportados para dentro das células por sistemas secundários de transporte ativo.

Os sistemas de transporte ativo primários mais importantes são as bombas iônicas (ATPases transportadoras de íons ou bombas ATPases)

As bombas ATPases são classificadas em quatro grupos (Tabela 8.3; Figs. 23.3-23.5Fig. 23.4Fig. 23.5). As ATPases de fatores de acoplamento (F-ATPases) na mitocôndria, cloroplasto e membranas bacterianas hidrolisam o ATP e transportam íons hidrogênio (H^+). Como discutido em detalhes no próximo capítulo, a F-ATPase mitocondrial trabalha em direção inversa, sintetizando ATP a partir do ADP e fosfato à medida que os prótons se movem a favor de um gradiente eletroquímico (concentração e carga) gerado através da membrana interna da mitocôndria durante o metabolismo oxidativo. O produto, ATP, é liberado dentro da matrix mitocondrial, mas é necessário para as reações biossintéticas no citoplasma. O ATP é transportado para o citoplasma através de uma translocase ATP-ADP na membrana interna mitocondrial. Essa translocase é um exemplo de sistema antiporte (Fig. 8.1C); ela permite que uma molécula de ADP entre somente se uma molécula de ATP sair simultaneamente.

Tabela 8.3 Transportadores ativos primários em células eucarióticas. Vários exemplos de transportadores ativos primários (bombas ATPases) são lista-dos juntos com suas localizações.

Grupo	Membro	Localização	Substrato(s)	Funções
F-ATPase (fator de acoplamento)	H^+-ATPase	Membrana interna da mitocôndria	H^+	Síntese de ATP dirigida por gradiente eletroquímico de H^+
V-ATPase (vacuolar)	H^+-ATPase	Vesículas citoplasmáticas (lisozima, grânulos secretórios), membranas plasmáticas (borda enrugada dos osteoclastos, célula epitelial renal)	H^+	Ativação das enzimas lisossomais, acúmulo de neurotransmissores, reciclagem óssea, acidificação da urina
P-ATPase (fosforilação)	Na^+/K^+-ATPase	Membranas plasmáticas (ubíquo, mas abundante nos rins e coração)	Na^+ e K^+	Geração de gradiente eletroquímico de Na^+ e K^+
	H^+/K^+-ATPase	Estômago (célula parietal na glândula gástrica)	H^+ e K^+	Acidificação do lúmen do estômago
	Ca^{2+}-ATPase	Retículo sarcoplasmático e retículo endoplasmático	Ca^{2+}	Sequestro de Ca^{2+} para dentro do retículo sarcoplasmático (endoplasmático)
	Ca^{2+}-ATPase	Membrana plasmática	Ca^{2+}	Excreção de Ca^{2+} para fora da célula
	Cu^{2+}-ATPase	Membrana plasmática e vesículas citoplasmáticas	Cu^{2+}	Absorção de Cu^{2+} do intestino e excreção do fígado
Transportador ABC (região de ligação do ATP)	Glicoproteína P	Membrana plasmática	Várias drogas	Excreção de substâncias nocivas, resistência a múltiplas drogas antineoplásicas
	MRP	Membrana plasmática	Glutationa conjugada	Detoxificação, resistência a múltiplas drogas
	CFTR*	Membrana plasmática	Cl^-	Canal de cloreto dependente de cAMP regulação de outros canais
	TAP	Retículo endoplasmático	Peptídeo	Apresentação de peptídeos para a resposta imune

**Alguns transportadores ABC funcionam como canais ou reguladores de canais. MRP, proteína associada à resistência a múltiplas drogas; CFTR, regulador de condutância transmembrana da fibrose cística; TAP, transportador associado com processamento de antígeno.*



DOENÇAS DE MENKES E WILSON

A doença de Menkes ligada ao X é uma desordem letal que ocorre em uma a cada 100.000 crianças nascidas e é caracterizada por cabelo anormal e hipopigmentado, face característica, degeneração cerebral, defeitos nos tecido conectivo e vascular, e morte em torno dos três anos de idade. Uma P-ATPase transportadora de cobre que é expressa em todos os tecidos exceto no fígado é defeituosa nessa doença (Tabela 8.3). Em pacientes com a doença de Menkes, o cobre entra nas células intestinais, mas não é transportado posteriormente, resultando em severa deficiência de cobre. A administração subcutânea de um complexo de cobre e histidina pode ser um tratamento efetivo se iniciado precocemente.

O gene para a doença de Wilson também codifica uma P-ATPase transportadora de cobre e é 60% idêntico ao gene de Menkes. Ele é expresso no fígado, rins e placenta. A doença de Wilson ocorre em 1 a cada 35.000-100.000 recém-nascidos e é caracterizada por falha em incorporar cobre na ceruloplasmina do fígado e falha em excretar cobre do fígado para a bile, resultando em acúmulo tóxico de cobre no fígado e também nos rins, cérebro e córnea. Cirrose hepática, dano neurológico progressivo ou ambos ocorrem durante a infância até a adolescência. Os agentes quelantes tais como penicilamina são usados para o tratamento dos pacientes com essa doença. O tratamento com zinco oral pode ser útil para a redução da absorção do cobre da dieta.

Comentário. O cobre é um metal essencial e um componente integral de muitas enzimas. Entretanto, ele é tóxico em excesso porque se liga a proteínas e ácidos nucleicos, aumenta a geração de radicais livres e catalisa a oxidação de lipídios e proteínas nas membranas (Cap. 37).

As vesículas citoplasmáticas, tais como lisossomas, endossomas e grânulos secretores, são acidificadas por uma H^+-ATPase tipo V (vacuolar) em suas membranas. A acidificação por essa V-ATPase é importante para a atividade das enzimas lisossomais que têm pH ácido ótimo e para o acúmulo de fármacos e neurotransmissores nos grânulos secretores. A V-ATPase também acidifica o meio ambiente extracelular dos osteoclastos e células epiteliais renais. Defeitos na V-ATPase da membrana plasmática dos osteoclastos resultam em osteopetrose (aumento na densidade óssea), enquanto mutação na ATPase nos ductos coletores renais causa acidose tubular renal. As ATPases dos tipos F e V são estruturalmente similares e parecem ser derivadas de um ancestral comum. A subunidade catalítica ligante de ATP e a subunidade formadora da via H^+ são conservadas entre essas ATPases.

As P-ATPases formam intermediários fosforilados que direcionam a translocação dos íons: o "P" se refere à fosforilação. Esses transportadores têm um sítio ativo no resíduo de aspartato que é reversivelmente fosforilado pelo ATP durante o processo de transporte. A Na^+/K^+-ATPase do tipo P em vários tecidos e a Ca^{2+}-ATPases no retículo sarcoplasmático têm importantes papéis na manutenção dos gradientes iônicos celulares. As Na^+/K^+-ATPases também criam um gradiente eletroquímico de Na^+ que produz a força responsável pela absorção de nutrientes pelo intestino (ver adiante). A descarga desse gradiente eletroquímico também é fundamental para o processo de transmissão nervosa (Cap. 40). Mutações nos genes da P-ATPase causam a cardiomiopatia de Brody (Ca^{2+}-ATPase), enxaqueca hemiplégica familiar do tipo 2 (Na^+/K^+-ATPase) e as doenças de Menkes e Wilson (Cu^{2+}-ATPases).

Os transportadores que ligam ATP (ABC) compreendem a quarta família de transportadores ativos. "ABC" é a abreviação para "ATP-binding cassette", que se refere a uma região de ligação ao ATP no transportador (Tabela 8.3). A glicoproteína P ("P" = permeabilidade) e MRP (proteína associada à resistência a múltiplas drogas), as quais possuem papel fisiológico na excreção de metabólitos tóxicos e xenobióticos, contribuem para a resistência de células tumorais à quimioterapia. Os transportadores TAP, uma classe de transportadores ABC associados com a apresentação de antígeno, são necessários para a iniciação da resposta imune contra proteínas estranhas; eles medeiam o transporte do peptídeo antigênico do citosol para o retículo endoplasmático. Alguns transportadores ABC estão presentes nas membranas dos peroxissomos onde parecem estar envolvidos no transporte de enzimas dessas organelas necessárias para a oxidação de ácidos graxos de cadeia muito longa. Defeitos nos transportadores ABC estão associados com várias doenças (quadro na página 92).

DOENÇA DOS TRANSPORTADORES ABC

Os dados do genoma humano sugerem que existem cerca de 50 genes para os transportadores ABC. Uma ampla e incomum variedade de doenças é causada por defeitos nos transportadores ABC, incluindo doença de Tangier, doença de Stargardt, colestase intra-hepática progressiva, síndrome de Dubin-Johnson, pseudoxantoma elástico, hipoglicemia hiperinsulínica persistente familiar da infância (PHHI), adrenoleucodistrofia, síndrome de Zellweger, sitosterolemia e fibrose cística.

A fibrose cística (FC) é a doença autossômica recessiva mais comum e potencialmente letal nas populações caucasianas, afetando um a cada 2.500 recém-nascidos. A FC é comumente manifestada como insuficiência pancreática exócrina, aumento na concentração de íons cloreto (Cl^-) no suor,

infertilidade masculina e doença das vias aéreas, que é a principal causa de morbidade e mortalidade. As patologias pancreática e pulmonar resultam a partir da viscosidade aumentada dos fluidos secretados (mucoviscosidose). A FCF é causada por mutações no gene CFTR (regulador da condutância transmembrana na fibrose cística), o qual codifica o canal de Cl^-. A ligação de ATP ao CFTR é necessária para a abertura do canal. A falta da atividade desse canal no epitélio de pacientes com FC afeta tanto a secreção de íons quanto de água.

Uniporte, simporte e antiporte são exemplos de transporte ativo secundàrio

Os processos de transporte podem ser classificados em três tipos gerais: uniporte (monoporte), simporte (cotransporte) e antiporte (contratransporte) (Fig. 8.1). O transporte de substratos se move na mesma direção durante o simporte e em direções opostas durante o antiporte. O uniporte de substratos carregados pode ser eletroforeticamente direcionado pelo potencial de membrana da célula. O movimento de um substrato contra seu gradiente de concentração pode ser dirigido pelo antiporte de outro substrato (normalmente um cátion, como Na^+ ou H^+) a favor do gradiente. As proteínas participantes desses sistemas de transporte são denominadas uniportes, simportes e antiportes, respectivamente (Tabela 8.1). Alguns exemplos são apresentados adiante.

GRADIENTES DE ÍONS

Gradiente de concentração e gradiente eletroquímico de íons

A permeabilidade da maioria dos não eletrólitos através das membranas pode ser analisada assumindo-se que o passo limitante é a difusão dentro da bicamada lipídica. Sua permeabilidade através da bicamada fosfolipídica é experimentalmente mostrada como uma função do coeficiente de partição em solventes orgânicos. A taxa relativa de difusão simples de uma molécula através da membrana é, portanto, proporcional ao seu gradiente de concentração através da bicamada e à hidrofobicidade da molécula. Para moléculas carregadas e íons, o transporte através da membrana tem de ser facilitado por um transportador ou canal e é dirigido pelo gradiente eletroquímico, uma combinação do gradiente de concentração (potencial químico) e o gradiente de voltagem através da membrana (potencial elétrico). Essas forças podem agir na mesma direção ou em direções opostas.

No caso dos íons Na^+, a diferença de concentração entre o lado externo (145 mM) e o interno (12 mM) da célula é um fator de cerca de 10, sendo mantido pela Na^+/K^+-ATPase. A Na^+/K^+-ATPase é eletrogênica, bombeando para fora três íons Na^+ e para dentro dois íons K^+, gerando um potencial de membrana negativo no lado interno. O K^+ vai para o lado externo através dos canais de K^+, a favor do gradiente de concentração (140 mM para 5 mM), promovendo o aumento no potencial elétrico. O gradiente de concentração dos íons Na^+ e o potencial elétrico (negativo dentro) forçam a importação e a exportação de outras moléculas com Na^+ contra seu gradiente de concentração por simportes e antiportes, respectivamente.

Transporte e mobilização de Ca^{2+} no músculo

O músculo estriado (esquelético e cardíaco) é composto por feixes de células musculares (Cap. 20). Cada célula é embalada com feixes de filamentos actina e miosina (miofibrilas) que produzem a contração. Durante a contração muscular, os nervos da junção neuromuscular estimulam a despolarização local da membrana pela abertura dos canais de Na^+ dependentes de voltagem. A despolarização se espalha rapidamente para dentro das invaginações da membrana plasmática, chamadas de túbulos transversos (T), as quais se estendem em torno das miofibrilas (Fig. 20.5).

Os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (CCVD) localizados nos túbulos T dos músculos esqueléticos mudam sua conformação em resposta à despolarização da membrana e ativam diretamente um canal liberador de Ca^{2+} na membrana do retículo sarcoplasmático, uma rede de túbulos achatados que circundam cada miofibrila no citoplasma da célula muscular. O escape de Ca^{2+} do lúmen (compartimento interior) do retículo sarcoplasmático aumenta as concentrações de Ca^{2+} citoplasmático (despolarização induzida por liberação de Ca^{2+}) em cerca de 100 vezes, de 10^{-4} mmol/L (0,0007 mg/L) para cerca de 10^{-2} mmol/L (0,07 mg/dL), disparando a hidrólise de ATP pela miosina, a qual inicia a contração muscular. Posteriormente, uma Ca^{2+}-ATPase no retículo sarcoplasmático hidrolisa o ATP para transportar o Ca^{2+} de volta do citoplasma para dentro do lúmen do retículo sarcoplasmático, diminuindo o Ca^{2+} citoplasmático e permitindo o relaxamento muscular (Fig. 8.4, esquerda).

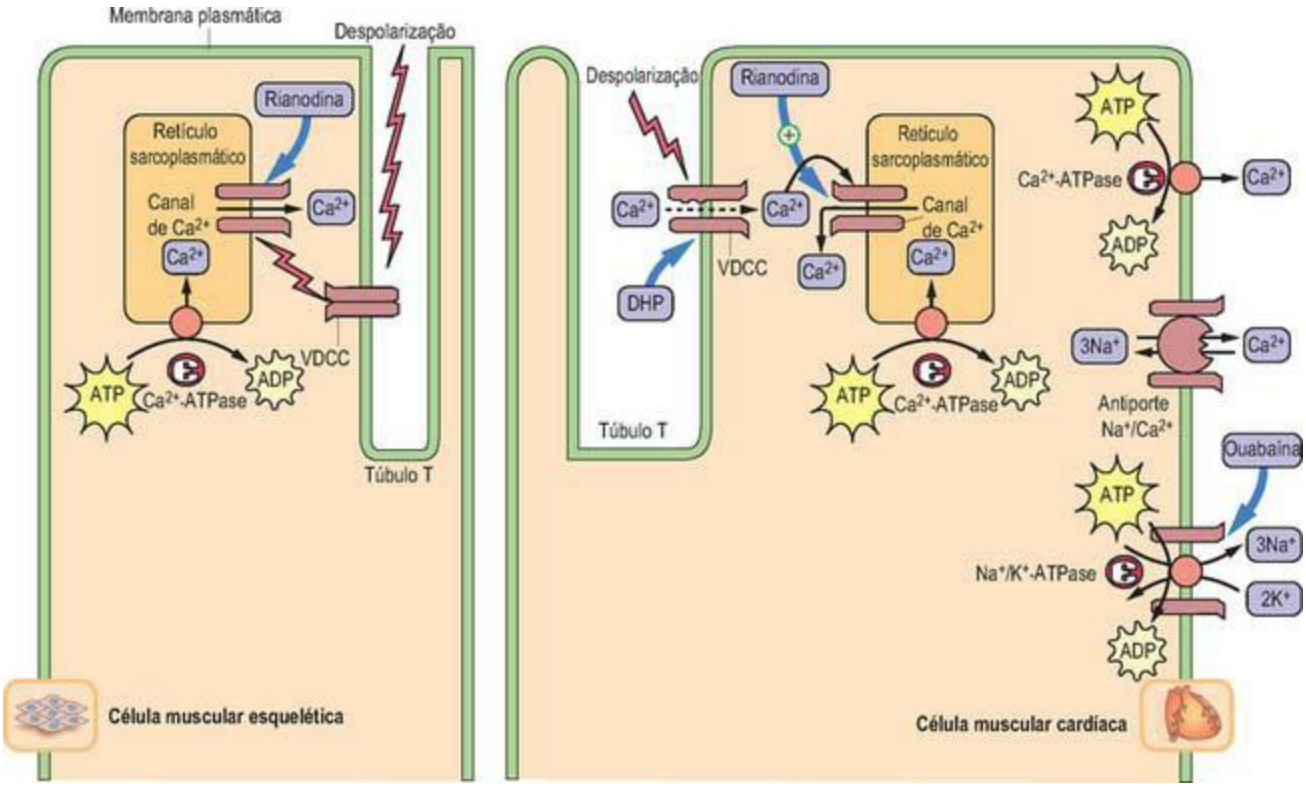


Fig. 8.4 Movimento de Ca^{2+} no ciclo de contração muscular. Papel dos transportadores no movimento de Ca^{2+} nas células

musculares esquelética (esquerda) e cardíaca (direita) durante a contração. As setas grossas indicam os sítios de ligação para os inibidores. No músculo esquelético, os CCVDs ativam diretamente a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. O aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático dispara a contração muscular. A Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático bombeia Ca^{2+} de volta para o lúmen, diminuindo a concentração citoplasmática de Ca^{2+} e o músculo relaxa. No músculo cardíaco, CCVDs permitem a entrada de pequenas quantidades de Ca^{2+} que induzem a liberação de Ca^{2+} do lúmen do retículo sarcoplasmático. Dois tipos de antiporte de Ca^{2+}-ATPase e um Na^{+}/Ca^{2+}-ATPase são responsáveis pelo bombeamento de Ca^{2+} citoplasmático para fora da célula muscular. O antiporte Na^{+}/Ca^{2+} utiliza o gradiente de sódio (Na^{+}) produzido pela Na^{+}/K^{+}-ATPase para antiporte de Ca^{2+}. DHP, di-hidropiridina, nifedipina, um bloqueador de canal de cálcio usado para o tratamento da hipertensão.

No músculo cardíaco, os CCVD permitem a entrada de pequenas quantidades de Ca^{2+}, que então estimula a liberação de Ca^{2+} através do canal de Ca^{2+} do lúmen do retículo sarcoplasmático (liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+}). Não somente a Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático, mas também um antiporte Na^{+}/Ca^{2+} e uma Ca^{2+}-ATPase de membrana plasmática são responsáveis pelo bombeamento do Ca^{2+} citoplasmático para o lado externo do músculo cardíaco (Fig. 8.4, direita). A rápida restauração dos gradientes iônicos permite as contrações rítmicas do coração.

Papel da Na^{+}/K^{+}-ATPase na absorção de glicose

O transporte de glicose sanguínea para dentro das células geralmente ocorre por difusão facilitada, visto que a concentração intracelular de glicose é tipicamente menor do que a do sangue (Tabela 8.2). Em contraste, o transporte de glicose do intestino para o sangue envolve os processos de difusão facilitada e o transporte ativo (Fig. 8.5). O transporte ativo é especialmente importante para a recuperação máxima de açúcares do intestino quando a concentração intestinal de glicose cai abaixo da do sangue.

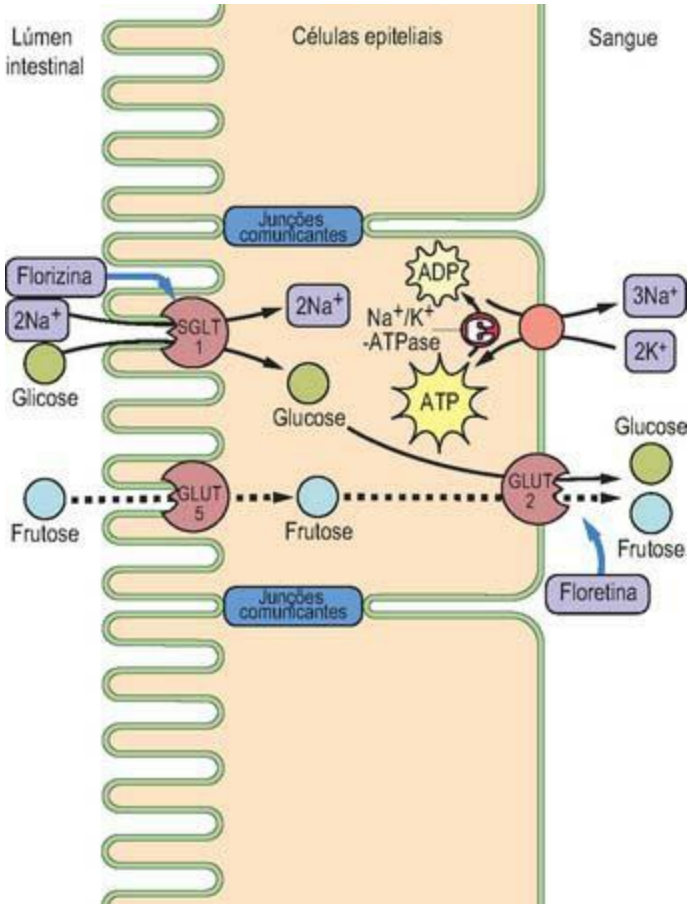


Fig. 8.5 Transporte de glicose do lúmen intestinal para o sangue. A glicose é bombeada para a célula através de um simporte de glicose acoplado a Na^+ (SGLT1), e passa para o lado externo da célula por difusão facilitada mediada pelo uniporte GLUT-2. O gradiente de Na^+ para o simporte de glicose é mantido pela Na^+/K^+-ATPase, que mantém baixa a concentração intracelular de Na^+. O SGLT1 é inibido pela florizina e o GLUT-2 pela floretina. O GLUT-5 insensível à floretina catalisa a absorção de frutose por difusão facilitada. A frutose é então exportada através do GLUT-2. Um defeito na SGLT1 causa má absorção de glicose/galactose. Células adjacentes estão conectadas pelas junções comunicantes impermeáveis, as quais previnem os solutos de cruzar o epitélio.

Um simporte SGLT1 de glicose acoplado ao Na^+ é direcionado pelo gradiente de Na^+ formado pela Na^+/K^+-ATPase, que transporta glicose para dentro da célula epitelial intestinal, enquanto o GLUT-2 facilita o deslocamento da glicose para a circulação porta (Fig. 8.5). Uma via similar opera nos rins.

Os rins constituem um sistema de ultrafiltração que filtra pequenas moléculas do sangue. Entretanto, glicose, aminoácidos, muitos íons e outros nutrientes no ultrafiltrado são quase completamente reabsorvidos nos túbulos proximais, por processos simporte. A glicose é reabsorvida primariamente pelo transportador 2 de sódio glicose (SGLT2; estequiometria de um para um para Na^+:Glc) para as células epiteliais do túbulo proximal renal. Quantidades muito menores de glicose são recuperadas pelo SGLT1 em um segmento posterior do túbulo, o qual acopla o transporte de uma molécula de glicose com dois íons sódio. A concentração de Na^+ no filtrado é de 140 mmol/L (322 mg/dL), enquanto dentro das células epiteliais é de 30 mmol/L (69 mg/dL), de modo que o Na^+ flui "ladeira abaixo" juntamente com seu gradiente, arrastando a glicose "para cima" contra seu gradiente de concentração. Assim como nas células epiteliais, a baixa concentração intracelular de Na^+ é mantida por uma Na^+/K^+-ATPase no lado oposto da célula epitelial tubular, a qual antiporta três íons sódio citoplasmáticos para dois íons potássio extracelulares, acoplados com a hidrólise de uma molécula de ATP.

MODULAÇÃO DA ATIVIDADE TRANSPORTADORA NO DIABETES

O canal de K^+ sensível à ATP (K_{ATP}) participa da regulação da secreção de insulina nas células β da ilhota pancreática. Quando a concentração sanguínea de glicose aumenta, esta é transportada para dentro das células β através do transportador de glicose (GLUT-2) e metabolizada, resultando em um aumento na concentração citoplasmática de ATP. O ATP se liga à subunidade regulatória do canal de K^+, K_{ATP}-β (chamado de receptor sulfonilureia, SUR1), causando mudança estrutural da subunidade K_{ATP}-α, a qual fecha o canal de K_{ATP}. Isso induz despolarização da membrana plasmática (reduz o gradiente de voltagem através da membrana) e ativa os canais de cálcio voltagem-dependentes (CCVDs). A entrada de cálcio estimula a exocitose das vesículas que contêm insulina. A ligação da sulfonilureias, como tolubutamida e glibenclamida, ao K_{ATP}-β no lado externo da membrana plasmática mimetiza o efeito regulatório do ATP intracelular. As sulfonilureias estimulam a secreção de insulina, a qual reduz a concentração sanguínea de glicose no diabetes. Os canais de K_{ATP} defeituosos, os quais são incapazes de transportar K^+, induzem baixas concentrações sanguíneas de glicose, uma condição chamada de hiperglicemia hiperinsulinêmica persistente da criança (PHHI), que ocorre em uma a cada 50.000 pessoas como resultado da perda da função do canal de K^+ e contínua secreção de insulina (Cap. 21).

VÁRIAS DROGAS INIBEM OS TRANSPORTADORES NO MÚSCULO

Fenilalquilamina (verapamil), benzodiazepina (diltiazem) e di-hidropiridina (DHP, nifedipina) são bloqueadores de canais de Ca^{2+} que inibem os CCVDs (Fig. 8.4). A rianodina inibe o canal liberador de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático. Essas drogas são usadas como agentes anti-hipertensivos para inibir o aumento da concentração citoplasmática de Ca^{2+} e, assim, a força da contração muscular. Em contraste, os glicosídeos cardíacos, como a ouabaína e a digoxina, aumentam a contração do músculo cardíaco e são usadas para o tratamento da falência cardíaca congestiva. Eles agem pela inibição da Na^+/K^+-ATPase, que gera o gradiente de concentração de Na^+ usado para direcionar a exportação de Ca^{2+} pelo antiporte Na^+/Ca^{2+}. Venenos de cobra, como a α-bungarotoxina e a tetrodotoxina do peixe Puffer, inibem os canais de Na^+ voltagem-dependentes. A lidocaína, um bloqueador de canais de Na^+, é usada como uma droga anestésica local e antiarrítmica. A inibição dos canais de Na^+ reprime a transmissão do sinal de despolarização.

Acidificação do suco gástrico por uma bomba de próton no estômago

O lúmen do estômago é altamente ácido (pH ≈ 1) por causa da presença de uma bomba de prótons (Na^+/K^+-ATPase; P-ATPase na Tabela 8.3) que é especificamente expressa nas células gástricas Parietais. No estado de repouso, a bomba de próton gástrica está localizada nas vesículas intracelulares. Estímulos como histamina e gastrina induzem a fusão das vesículas com a membrana plasmática (Fig. 8.6A). A bomba antiporta dois prótons citoplasmáticos e dois íons potássio

extracelulares, acoplados com hidrólise de uma molécula de ATP; assim, isso é chamado de H^+/K^+-ATPase. O contraíon Cl^- é secretado através de um canal de Cl^-, produzindo o ácido clorídrico (HCl) (ácido gástrico) no lúmen (Fig. 8.6B).

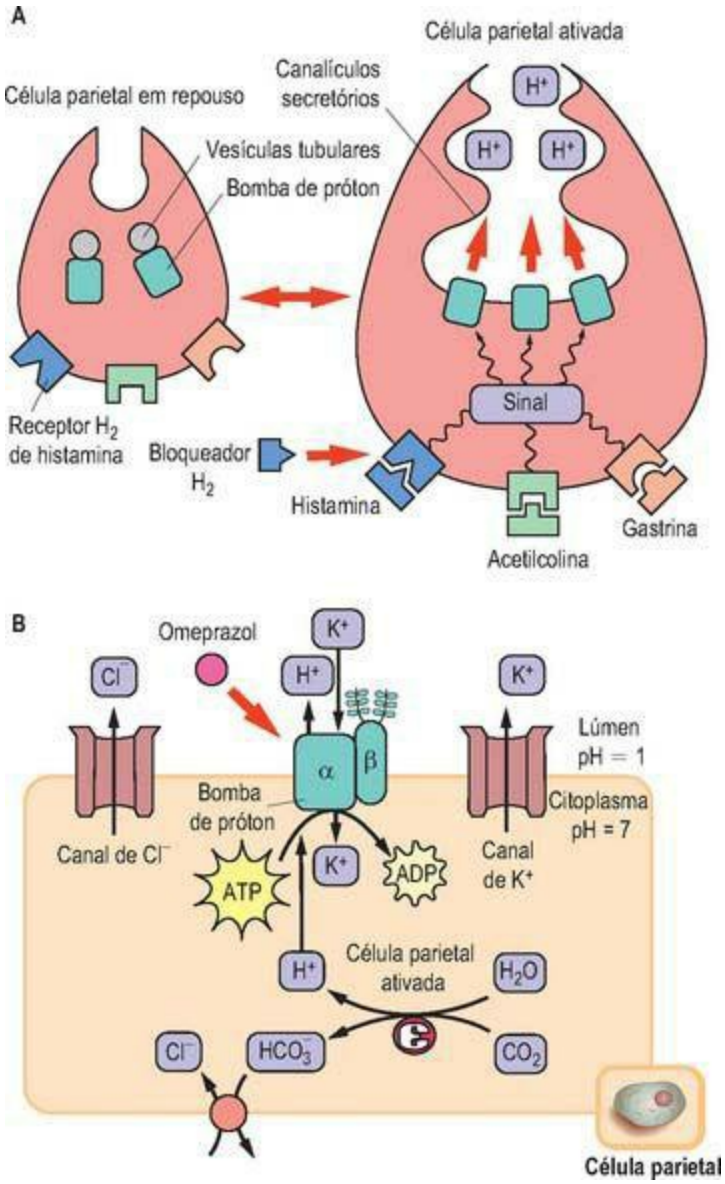


Fig. 8.6 Secreção ácida pelas células parietais gástricas. (A) A secreção ácida é estimulada pelos sinais extracelulares e acompanhada por mudanças morfológicas nas células parietais, do repouso (esquerda) para o estado ativado (direita). A bomba de prótons (H^+/K^+-ATPase) se move para o canalículo secretório (membrana plasmática) das vesículas tubulares citoplasmáticas. Os bloqueadores H_2 competem com a histamina nos receptores H_2 de histamina. (B) Balanço iônico na célula parietal. Os H^+ transportados pela bomba de prótons são fornecidos pela anidrase carbônica. Bicarbonato, o outro produto dessa enzima, é transportado em troca do Cl^-, o qual é secretado através do canal de Cl^-. Os íons potássio importados pela bomba de prótons são novamente excretados pelo canal de K^+. A bomba de prótons tem uma unidade catalítica α e β-glicosilada. O fármaco omeprazol modifica covalentemente os resíduos de cisteína localizados no domínio extracitoplasmático da subunidade α e inibe a bomba de prótons. As setas cheias indicam os locais de ligação para os inibidores.

INIBINDO A BOMBA DE PRÒTONS GÁSTRICA E ERRADICAÇÃO DO *Helicobacter pylori*

Uma forte secreção ácida crônica pela bomba de prótom gástrica lesiona o estômago e o duodeno, levando a úlceras gástricas e duodenais. Os inibidores das bombas de prótons, como o omeprazol, são distribuídos para as células parietais a partir da circulação após administração oral. O omeprazol é um pró-fármaco; ele se acumula no compartimento ácido, já que é uma base fraca, e é convertido ao composto ativo sob as condições ácidas no lúmen gástrico. A forma ativa modifica covalentemente resíduos de cisteína localizados no domínio extracitoplasmático da bomba de próton. Os bloqueadores H_2 (antagonistas do receptor) como cimetidina e ranitidina inibem indiretamente a secreção ácida pela competição com a histamina pelos seus receptores (Fig. 8.6).

Comentário. A infecção do estômago por *Helicobacter pylori* também causa úlceras e está associada a risco aumentado de adenocarcinoma gástrico. Recentemente, o tratamento com antibiótico foi introduzido para erradicar o *H. pylori*. Interessantemente, o tratamento com antibiótico junto com o omeprazol é muito mais efetivo, possivelmente por causa de uma estabilidade aumentada do antibiótico na condição fracamente ácida produzida pela inibição da bomba de próton.

Resumo

A maioria das propriedades de permeabilidade da membrana é determinada pelas proteínas de transporte, as quais são proteínas integrais de membrana. O transporte mediado por proteína é um processo saturável com alta especificidade pelo substrato. A difusão facilitada é catalisada por transportadores que permitem o movimento de íons e moléculas a favor de gradiente de concentração, enquanto o transporte ativo necessita de energia. O transporte ativo primário é catalisado pelas bombas ATPases que usam energia produzida pela hidrólise do ATP. O transporte ativo secundário usa os gradientes eletroquímicos de Na^+ e H^+ ou potencial de membrana produzido pelos processos primários de transporte ativo. Uniporte, simporte e antiporte são exemplos de transporte ativo secundário.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Descreva as similaridades entre as cinéticas de ação de enzima e processos de transporte. Compare as propriedades dos vários transportadores de glicose com aqueles da hexoquinase e glicoquinase, ambos cineticamente e em termos de função fisiológica.

2. Identifique vários inibidores de transportadores usados na medicina clínica, p. ex. bloqueadores de canais de Ca^{2+}, laxantes e inibidores da secreção ácida gástrica.

3. Investigue o processo de transporte de glicose através da barreira hematoencefálica e explique a patogênese do coma hipoglicêmico.

4. Estude o papel e a especificidade dos transportadores ABC na resistência a múltiplas drogas dos agentes quimioterápicos.

Vários substratos como íons, nutrientes, pequenas moléculas orgânicas incluindo drogas e peptídeos e proteínas são transportados por vários transportadores. Todos esses transportadores são indispensáveis para a homeostasia. A expressão de um único grupo de transportadores é importante para funções específicas da célula como contração muscular, absorção de nutrientes e íons pelas células epiteliais intestinais, reabsorção de nutrientes pelas células renais e secreção de ácido pelas células parietais gástricas.

Leituras sugeridas

Camargo SM, Brockenhauer D, Kleta R. Aminoacidurias: clinical and molecular aspects. *Kidney Int*. 2008;73:918-925.

Klein I, Sarkadi B, Varadi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1461:237-262.

Lage H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;22:188-199.

Linton KJ. Structure and function of ABC transporters. *Physiology*. 2007;22:122-130.

Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr*. 2003;89:3-9.

Sites

Revisões gerais Revisões gerais:

- http://fajerpc.magnet.fsu.edu/Education/2010/Lectures/12_Membrane_Transport.htm
- http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/Diffusion.html#direct
- www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/carriers.htm

Transportadores ABC humanos. http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm.

P-ATPase P-ATPase. http://biobase.dk/%7Eaxe/Patbase.html.

Animações Animações:

- www.stolaf.edu/people/giannini/biological%20anamations.html
- www.wiley.com/legacy/college/boyer/0470003790/animations/membrane_transport/membrane_transport.htm
- www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/biomembrane1/quiz.html

Bioenergética e Metabolismo Oxidativo

L.W. Stillway

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever como a termodinâmica está relacionada à nutrição e à obesidade.
- Esboçar o sistema de transporte de elétrons mitocondrial mostrando oito dos principais carreadores de elétrons.
- Explicar como a ubiquinona, a heme e o complexo ferro-enxofre participam do transporte de elétrons.
- Definir potencial de membrana e explicar seu papel na síntese de ATP e na termogênese.
- Explicar o papel das proteínas desacopladoras na termogênese.
- Descrever o mecanismo da ATP sintase.
- Descrever os efeitos de inibidores como a rotenona, antimicina A, monóxido de carbono, cianeto e oligomicina no consumo de oxigênio pela mitocôndria.

INTRODUÇÃO

A oxidação de combustíveis metabólicos é essencial para a vida. Em organismos superiores, os combustíveis como os carboidratos e os lipídios são metabolizados para dióxido de carbono e água, gerando a "moeda" metabólica central, trifosfato de adenosina (ATP). A maior parte da energia metabólica é suprida por reações de oxidação-redução (redox) na mitocôndria. A regulação do metabolismo de energia não é de pequeno valor, uma vez que animais de sangue-quente têm demandas energéticas variáveis em processos como termogênese a baixas temperaturas, estimulação da síntese de ATP durante o estresse, degradação do alimento em excesso, utilização eficiente de nutrientes durante a fome e o acoplamento da síntese de ATP com a frequência respiratória, durante o trabalho ou exercício. Este capítulo proporcionará uma introdução ao conceito de energia livre, fosforilação oxidativa e de transdução de energia de combustíveis em trabalho útil. As vias e moléculas específicas pelas quais os elétrons são transportados até o oxigênio e o mecanismo de geração de ATP serão descritos e relacionados às estruturas da mitocôndria, a "casa de força" da célula e a principal fonte de ATP. Finalmente, esses processos bioquímicos serão aplicados à saúde e às doenças humanas.

OXIDAÇÃO COMO FONTE DE ENERGIA

Conteúdo energético dos alimentos

A nutrição e distúrbios como a obesidade, o diabetes e o câncer requerem, todas, o conhecimento da termodinâmica. A obesidade, por exemplo, é um distúrbio no qual ocorre um desequilíbrio entre o ganho e o gasto de energia. Desta forma, é importante que o conteúdo energético dos alimentos seja conhecido. Os valores de conteúdo energético comumente aceitos para as quatro principais categorias de alimentos estão mostrados na Tabela 9.1: o álcool está incluído porque é um componente dietético significante para algumas pessoas. Estes valores são obtidos pela combustão completa (oxidação) de amostras de cada alimento. Em termos biológicos, cerca de 40% da energia dos alimentos são conservados como ATP e os restantes 60% são liberados como calor.

Tabela 9.1 Conteúdo energético das principals classes de alimentos. Note que o termo termodinâmica, kcal (energia necessária para aumentar a temperatura de 1 kg (1 L de água em 1°C), é equivalente à Caloria comum nutricional, isto é, 1 Cal = 1 kcal, 1 kca I = 4,2 kJ.

O valor energético dos alimentos		
Combustível metabólico	**Conteúdo energético**	
	kJ/g	**kcal/g**
gorduras	38	9
carboidratos	17	4

proteínas	17	4
álcool	29	7

A taxa metabólica basal (TMB)

A taxa metabólica basal (TMB) é o total de energia calorífica liberada pelo corpo em repouso

Praticamente todas as reações do corpo são exotérmicas, e a soma de todas as reações que ocorrem em repouso é denominada de taxa metabólica basal (TMB), que pode ser medida por dois métodos básicos: calorimetria direta, onde o total de calor liberado por um animal é medido ao longo do tempo e por calometria indireta, onde a TMB é calculada a partir da quantidade de oxigênio consumido que está diretamente relacionado à TMB. Um homem adulto (70 kg) tem uma TMB de cerca de 7.500 kJ (1.800 kcal), e uma mulher cerca de 5.400 kJ (1.300 kcal) por dia; a TMB pode variar por um fator de dois entre indivíduos, dependendo da idade, do sexo, da massa corporal e da composição. A produção de calor pelas mitocôndrias responde pela maior parte da TMB. A elevação dos hormônios tireoidianos aumenta a TMB. A TMB é determinada sob condições controladas: após oito horas de sono, em posição reclinada, em estado pós-absortivo, tipicamente após 12 horas da refeição.

Um outro parâmetro frequentemente utilizado é a TMR, ou taxa de metabolismo em repouso, que é virtualmente o mesmo que a TMB, mas determinada em condições de menor restrição. A TMR é a medida do mínimo gasto de energia em repouso; é tipicamente cerca de 70% do gasto total de energia diário. Pesquisadores em fisiologia do exercício frequentemente empregam o termo MET, equivalentes metabólicos, como uma medida do gasto de energia em repouso. Uma caminhada, de lenta para vigorosa, é uma atividade de 2-4 MET/h; corrida vigorosa em uma esteira de exercícios pode consumir mais do que 15 MET/h.

Estágios da oxidação de combustíveis

A oxidação de combustíveis pode ser dividida em duas etapas gerais: a medula nucleotídea durante a oxidação dos combustíveis e o uso da energia livre da oxidação das coenzimas reduzidas para produzir o ATP (Fig. 9.1).



Fig. 9.1 Estágios da oxidação de combustíveis. NADH, nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida; $FADH_2$, flavina adenina dinucleotídeo reduzida.

ENERGIA LIVRE

A energia livre de Gibbs (ΔG) de uma reação é a quantidade máxima de energia que pode ser obtida de uma reação a temperatura e pressão constantes. As unidades de energia livre são de kcal/mol (kJ/mol). Não é possível medir a quantidade de energia livre absoluta de uma substância, mas quando um reagente A reage para formar o produto B, a variação de energia livre nessa reação, ΔG, pode ser determinada.

Para a reação A → B:

$$\Delta G = G_B - G_A$$

onde G^A e G^B são as energias livres de A e de B, respectivamente. Todas as reações em sistemas biológicos são consideradas como sendo reações reversíveis, de forma que a reação inversa, B → A, é numericamente equivalente, mas com sinal contrário.

Se há uma maior concentração de B do que A no equilíbrio, a conversão A → B é favorável – ou seja, a reação tende a ocorrer a partir de uma condição padrão na qual A e B estão em iguais concentrações. Nesse caso, a reação é dita ser uma reação espontânea ou exergônica e a energia livre dessa reação é definida como negativa: isto é, $\Delta G < 0$, indicando que a energia é liberada pela reação. Contrariamente, se a concentração de A é maior do que a de B no equilíbrio, a reação direta é dita desfavorável, não espontânea ou endergônica, e a reação tem uma energia livre positiva: isto é, B tende a formar A, mais do que A de formar B. Neste caso, um consumo de energia seria necessário para direcionar a reação A → B a partir da posição de equilíbrio para um estado padrão no qual A e B estão presentes em iguais concentrações. O total de energia livre disponível a partir de uma reação depende tanto de sua tendência de ocorrer diretamente a partir do estado padrão (ΔG) e da quantidade (moles) de reagente convertido no produto.

A energia livre de reações metablicas est relacionada às suas constantes de equilbrio

As medidas termodinâmicas são baseadas em condições padrão nos quais os reagentes e os produtos estão presentes em concentração 1 molar, a pressão de todos os gases é de 1 atmosfera e a temperatura é de 25°C (298°K). Mais comumente, as concentrações dos reagentes e dos produtos são então medidas após ser atingido o estado de equilíbrio. A energia livre padrão é representada pelo símbolo ΔG° e as variações biológicas de energia livre padrão são representadas pelo símbolo ΔG°', com o apóstrofo no símbolo designando pH 7,0. A energia livre disponível de uma reação pode ser calculada a partir de sua constante de equilíbrio pela equação de Gibbs:

$$\Delta G^{\circ\prime} = -RT \ln K'eq$$

onde T é a temperatura absoluta (°Kelvin), lnK'eq é o logaritmo natural da constante de equilíbrio, para a reação em pH 7, e R é a constante dos gases:

$$R = 8{,}3 JK^{-1} mol^{-1} \text{ ou } \sim 2 \text{ cal } K^{-1} mol^{-1}$$

Vários intermediários metabólicos comuns que você vai encontrar em seus estudos estão listados na Tabela 9.2, acompanhados das constantes de equilíbrio e suas energias livres para suas

reações de hidrólise. Estes intermediários com variações de energia livre iguais ou maiores ao do ATP, o transdutor de energia central da célula, são considerados compostos de alta energia e, geralmente, apresentam ligações anidrido ou tioéster. Os compostos de baixa energia listados são todos ésteres de fosfato e, comparativamente, não produzem tanta energia livre quando hidrolisados.

Tabela 9.2 Termodinâmica das reações de hidrólise. Constantes de equilíbrio e energia livre de hidrólise de vários intermediários metabólicos em pH 7 ($\Delta G°'$)

Metabólito	K'eq	$\Delta G°'$	
		(kJ mol^{-1})	(kcal mol^{-1})
fosfoenolpiruvato	$1,2 \times 10^{11}$	−61,8	−14,8
fosfocreatina	$9,6 \times 10^{8}$	−50,2	−12,0
1,3-bisfosfoglicerato	$6,8 \times 10^{8}$	−49,3	−11,8
pirofosfato	$9,7 \times 10^{5}$	−33,4	−8,0
acetil coenzima A	$4,1 \times 10^{5}$	−31,3	−7,5
ATP	$2,9 \times 10^{5}$	−30,5	−7,3
glicose-1-fosfato	$5,5 \times 10^{3}$	−20,9	−5,0
frutose-6-fosfato	$7,0 \times 10^{2}$	−15,9	−3,8
glicose-6-fosfato	$3,0 \times 10^{2}$	−13,8	−3,3

A reação de hidrólise da glicose-6-fosfato (Glc-6-P) é escrita como:

$$\text{Glc-6-P} + H_2O \rightarrow \text{Glicose} + \text{Pi}$$

$$\Delta G^{o'} = -13,8\text{kJ/mol}\ (-3,3\text{kcal/mol})$$

Esta reação tem uma energia livre negativa e ocorre espontaneamente. A reação inversa, a síntese da Glc-6-P a partir da glicose, requer gasto de energia.

CONSERVAÇÃO DE ENERGIA PELO ACOPLAMENTO COM A ADENOSINA TRIFOSFATO

Os sistemas vivos precisam transferir energia de uma molécula para outra sem perdê-la toda como calor. Alguma energia deve ser conservada em uma forma química de modo a promover reações biossintéticas não espontâneas. De fato, cerca da metade da energia obtida por oxidação de combustíveis metabólicos é canalizada para a síntese de ATP, um transdutor universal de energia em sistemas vivos. O ATP é frequentemente mencionado como uma moeda comum de energia metabólica, porque este é utilizado para suprir várias das reações dependentes de energia. O ATP consiste de uma base purínica, a adenina, a ribose, açúcar de cinco carbonos, e grupos de fosfato α, β e γ (Fig. 9.2). As duas ligações anidrido são ditas ligações de alta energia, porque uma vez que suas hidrólises geram uma grande variação negativa de energia livre. Quando o ATP é utilizado para o trabalho metabólico, estas ligações de alta energia são quebradas e o ATP é convertido para ADP ou para AMP.

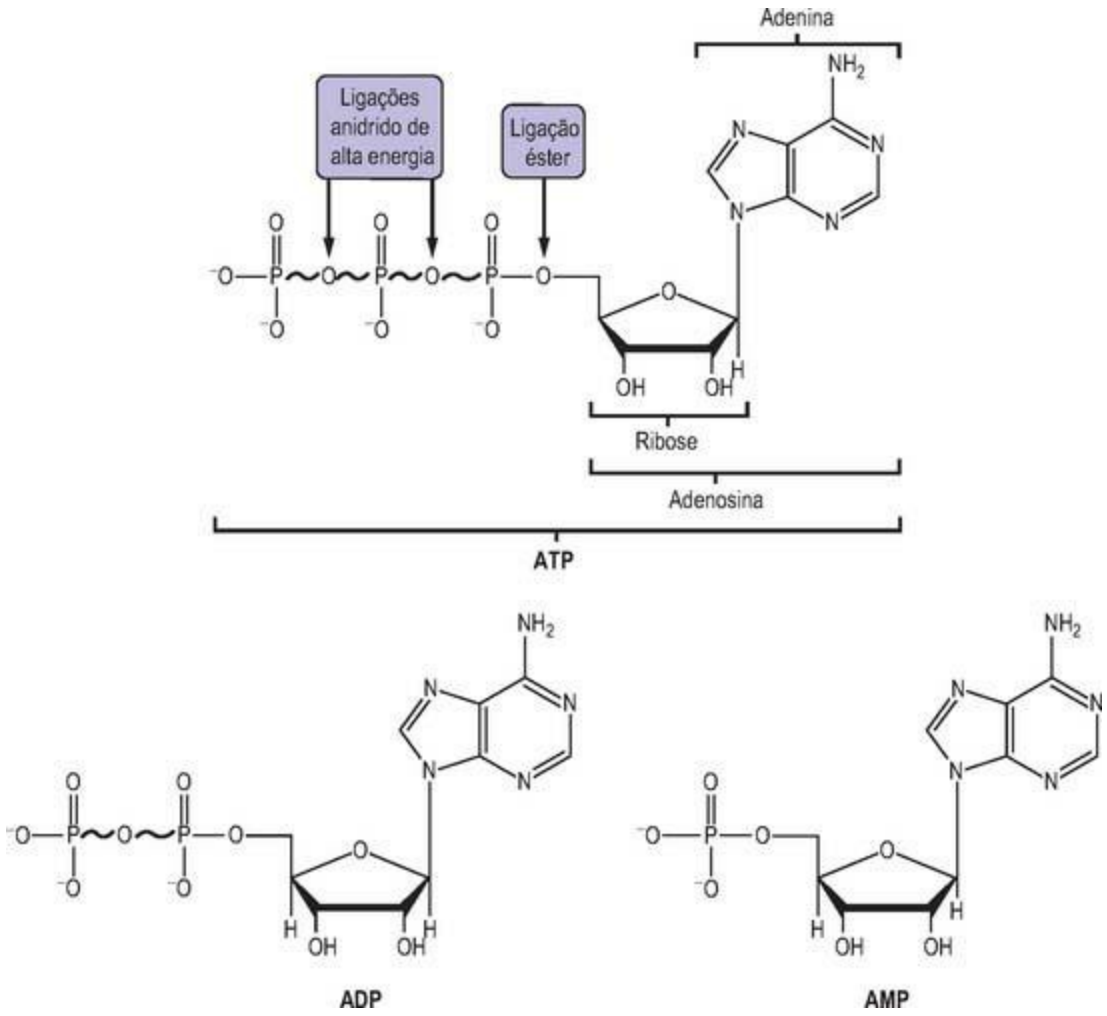


Fig. 9.2 Estrutura dos fosfatos de alta-energia. O ATP é mostrado junto aos seus produtos da hidrólise, difosfato de adenosina (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP)

ATP é normalmente utilizado para impulsionar reações biossintéticas

A energia livre de ligações de alta energia, como as ligações de fosfato anidrido do ATP, pode

ser utilizada para promover ou "empurrar adiante" reações que de outra forma não seriam espontâneas. De fato, praticamente todas as vias biossintéticas são termodinamicamente desfavoráveis, mas se tornam favoráveis pelo acoplamento a várias reações com a hidrólise de compostos de alta energia. Por exemplo, o primeiro passo no metabolismo da glicose é a síntese de Glc-6-P. Como mostrado na Tabela 9.2, esta não é uma reação espontânea: a hidrólise ($\Delta G°'$ = - 13,8kJ/mol ou - 3,3kcal/mol), mais do que a síntese ($\Delta G°'$ = + 13,8kJ/mol ou + 3,3kcal/mol) de Glc-6-P é uma reação espontânea. Entretanto, como mostrado adiante, a síntese de Glc-6-P (reação I) pode ser acoplada energeticamente à hidrólise de ATP (reação II), produzindo uma "reação líquida" III que é favorável para a síntese de Glc-6-P:

	$\Delta G°'$
I: Glc + Pi → Glc-6-P + H_2O	+3,3 kcal/mol
II: ATP + H_2O → ADP + Pi	-7,3 kcal/mol
Líquido: Glc + ATP → Glc-6-P + ADP	-4 kcal/mol

Isto é possível por conta da alta energia livre do 'potencial de transferência de grupo' do ATP. A transferência física do fosfato do ATP para a glicose ocorre em um sítio ativo de uma enzima quinase, como a glicoquinase. Esta característica, onde o ATP é utilizado para promover reações biossintéticas, processos de transporte ou atividade muscular, ocorre normalmente em vias metabólicas.

SÍNTESE MITOCONDRIAL DE TRIFOSFATO DE ADENOSINA A PARTIR DE COENZIMAS REDUZIDAS

O metabolismo de carboidratos começa no citoplasma através da via glicolítica (Cap. 12) enquanto a energia produzida a partir de ácidos graxos ocorre exclusivamente na mitocôndria. As mitocôndrias são organelas subcelulares, com tamanho similar ao das bactérias. Elas são essenciais para o metabolismo aeróbico nos eucariontes. Sua principal função é oxidar combustíveis metabólicos e conservar a energia livre sintetizando ATP.

As mitocôndrias são limitadas por um sistema de dupla membrana (Fig. 9.3). A membrana externa (MME) contém enzimas e proteínas de transporte e através da proteína porina (P), formadora de poro, são virtualmente permeáveis a todos os íons, pequenas moléculas (S) e a proteínas menores do que 10.000 Da. As proteínas grandes precisam ser transportadas *via* complexos TMME (translocase na membrana mitocondrial externa) e por TMMI (translocases na membrana mitocondrial interna). Isto é especialmente vital para a célula porque quase todas as proteínas mitocondriais são codificadas no núcleo e precisam ser transportadas para o interior da mitocôndria. O genoma mitocondrial, mtDNA, codifica 13 subunidades vitais de bombas de prótons e ATP sintase. A membrana mitocondrial interna (MMI) é pregueada por estruturas conhecidas como cristas e é impermeável à maioria dos íons e moléculas pequenas como os nucleotídeos (incluindo-se o ATP), coenzimas, fosfato e prótons. As proteínas transportadoras são necessárias para facilitar seletivamente a translocação de moléculas específicas através da membrana interna. A membrana interna também contém componentes da fosforilação oxidativa – o processo pelo qual coenzimas nucleotídeos reduzidos são oxidadas e o ATP sintetizado.

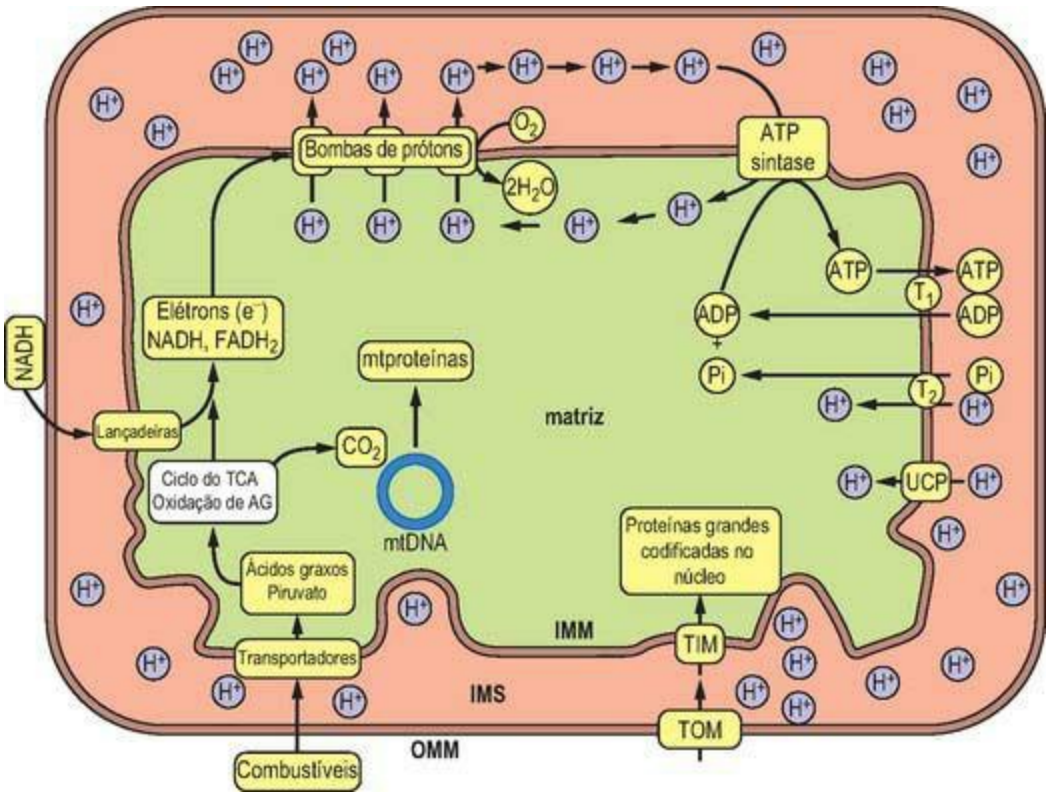


Fig. 9.3 Estrutura mitocondrial e vias de transdução de energia: o mecanismo de fosforilação oxidativa. Os principais combustíveis, como o piruvato e os ácidos graxos (FA), são transportados para o interior da matriz onde são oxidados para gerar CO_2 e

as coenzimas de nucleotídeos reduzidos NADH e $FADH_2$. A oxidação desses nucleotídeos através do sistema de transporte de elétrons reduz oxigênio à água e bombeia prótons (RELATÒRIO) por três bombeia prótons para fora da matriz e dentro do espaço intermembrana (EIM), criando um gradiente de pH que é o principal contribuinte para o potencial de membrana. Deve-se notar que os elétrons no espaço intermediário difundem-se livremente através da membrana externa *via* proteína porina, desta forma o espaço intermediário é bastante equivalente ao citosol. Embora o potencial de membrana seja composto principalmente pelo gradiente de prótons este é constituído de vários gradientes eletroquímicos e é expresso como uma voltagem. O controlado influxo de prótons através da ATP sintase potencializa a síntese de ATP pela ATP sintase. O ATP mitocondrial é então trocado pelo ADP citoplasmático através da ADP-ATP translocase (T_1). O fosfato (Pi), que é também necessário para a síntese de ATP, é transportado pela fosfato translocase (T_2). A membrana interna também contém proteínas desacopladoras (UCPs) que podem ser utilizadas para permitir a fuga de prótons retornando à matriz. MME, membrana mitocondrial externa; MMI, membrana mitocondrial interna; *mt*proteínas, proteínas mitocondriais; *mt*DNA, DNA mitocondrial; TMME e TMMI, complexos de proteínas translocase nas membranas mitocondriais externa e interna; TCA, ciclo do ácido tricarboxílico.

EXERCÍCIO E BIOGÊNESE MITOCONDRIAL

Há muito se sabe que o exercício aumenta a capacidade oxidativa dos músculos esqueléticos por induzir a biogênese mitocondrial. O exercício contínuo resulta em consumo de energia e acúmulo de AMP. A proteína cinase ativada por AMP (AMPK) é um sensor de combustíveis, desempenhando um papel crítico na iniciação de síntese de novos componentes de transporte mitocondrial como o heme. Tais mecanismos são importantes não só nos exercícios de treinamento, mas também na regeneração de tecidos após lesão tissular, como no trauma, infartos e acidente vascular cerebral.

NAD^+, FAD e FMN são as principais coenzimas redox

As principais coenzimas redox envolvidas na transdução de energia a partir de combustíveis para o ATP são a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), flavina adenina e flavina mononucleotídeo (FMN) (Fig. 9.4). Durante o metabolismo energético, os elétrons são transferidos dos carboidratos e das gorduras para essas coenzimas, reduzindo-as para NADH, $FADH_2$, e $FMNH_2$. Em cada caso, dois elétrons são transferidos, mas difere o número de prótons transferidos. O NAD^+ aceita um íon hidreto (H^-) que consiste de um próton e de dois elétrons; o próton remanescente é liberado na solução. O FAD e o FMN recebem dois elétrons e dois prótons.

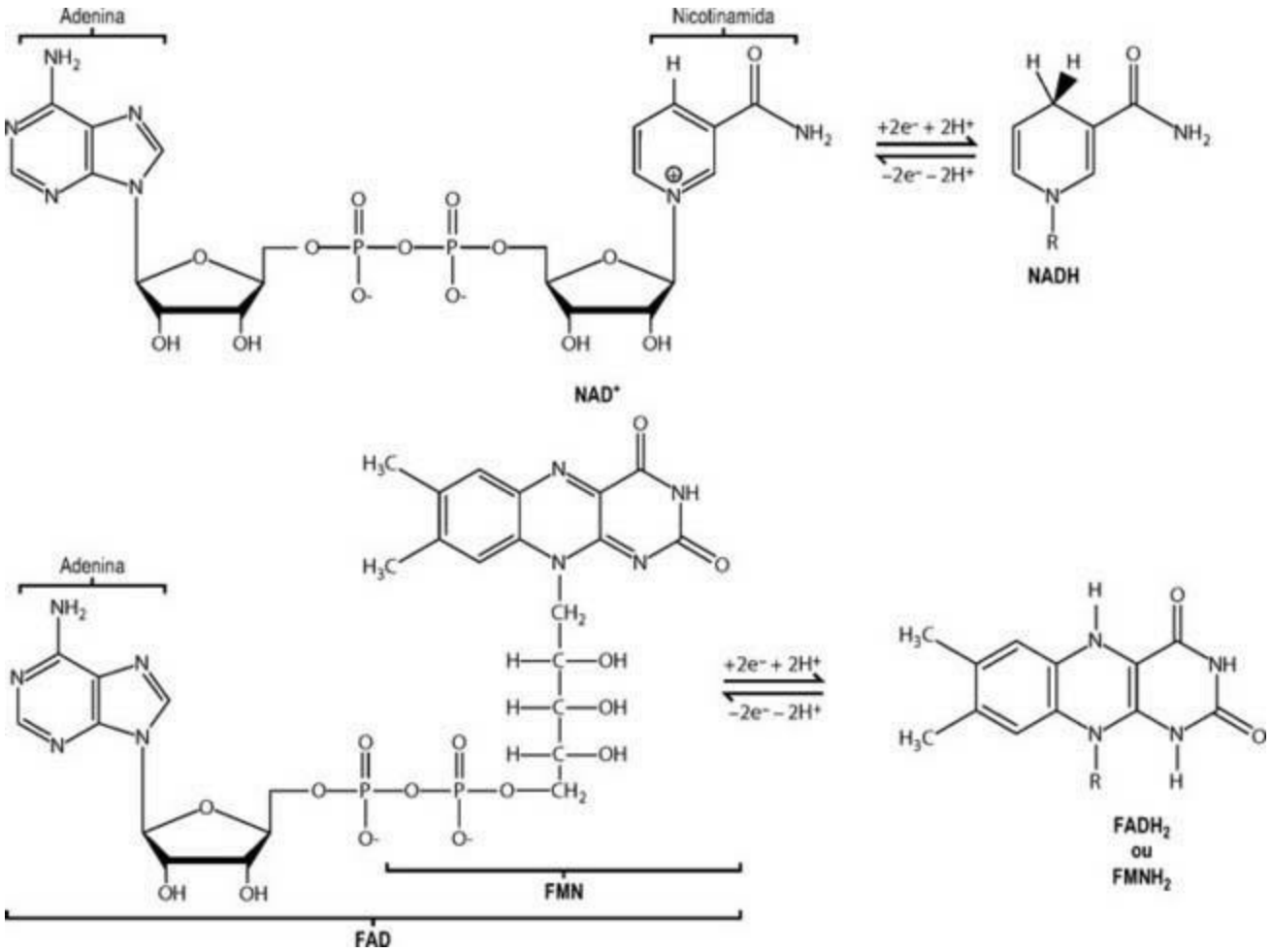


Fig. 9.4 As estruturas das coenzimas redox. NAD^+ e sua forma reduzida, NADH (nicotinamina adenina dinucleotídeo), consiste de adenina, duas unidades de ribose, dois fosfatos e nicotinamida. O FAD e sua forma reduzida, $FADH_2$ (adenina e flavina dinucleotídeo), consistem de riboflavina, dois fosfatos, ribose e adenina. FMN e $FMNH_2$ consistem de fosfato de riboflavina. Os componentes dessas coenzimas, nicotinamida e riboflavina, são oxidados e reduzidos, reversivelmente, durante as reações de transferência de elétrons (redox). O NADH e o $FADH_2$ são frequentemente denominados de nucleotídeos reduzidos ou coenzimas reduzidas.

A oxidação de nucleotídeos reduzidos pelo sistema de transporte de elétrons produz uma grande quantidade de energia livre. Quando a oxidação de 1 mol de NADH é acoplada à redução de 0,5 mol de oxigênio para formar água, a energia produzida é teoricamente suficiente para sintetizar sete

moléculas de ATP:

$$NADH + H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -220 kJ/mol\ (-52.4\ kcal/mol)$$

A FUNÇÃO METABÓLICA DO ATP REQUER MAGNÉSIO

O ATP prontamente forma um complexo com o íon magnésio e é este complexo que é necessário em todas as reações nas quais o ATP participa, incluindo a sua síntese. Uma deficiência em magnésio impede virtualmente todo o metabolismo porque o ATP nem pode ser formado nem utilizado em quantidades adequadas.

$$ADP + Pi \rightarrow ATP + H_2O$$
$$\Delta G^{\circ\prime} = -30{,}5\ kJ/mol\ (-7{,}3\ kcal/mol)\ (Tabela\ 9.2)$$

Dividindo-se 220 kJ/mol do ΔG°', disponível a partir da oxidação do NADH, por ΔG°'30,5, necessária para a síntese de ATP, o rendimento é teoricamente ~ 7 mol ATP/mol NADH. Como é discutido adiante, a produção real é mais próxima de 2,5 mol ATP/mol NADH oxidado.

A energia livre da oxidação do NADH é utilizada *via* sistema de transporte de elétrons para bombear prótons no espaço intermembrana. A energia produzida quando esses prótons retornam à matriz mitocondrial é utilizada para sintetizar ATP. Este processo é conhecido como fosforilação oxidativa (Fig. 9.3).

O SISTEMA MITOCONDRIAL DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS

O sistema de transporte de elétrons completo, também conhecido como cadeia de transporte de elétrons ou cadeia respiratória, está localizado na membrana mitocondrial interna (Fig. 9.5). Este consiste de vários complexos proteicos grandes, e de dois componentes pequenos e independentes – ubiquinona e citocromo *c*. Os componentes proteicos são, cada um, muito complexos: o complexo I, por exemplo, contém, no mínimo, 46 subunidades. Cada etapa na cadeia de transporte de elétrons envolve uma reação redox na qual deixa os componentes com potenciais de redução mais negativos e caminha para componentes com potenciais de redução mais positivos. Os elétrons são conduzidos por esse sistema em uma sequência definida dos nucleotídeos reduzidos até o oxigênio, e as variações de energia livre promovem o transporte de prótons desde a matriz até o interior do espaço intermembrana através de três bombas de prótons. Após cada etapa, os elétrons ficam em estado de menor energia.

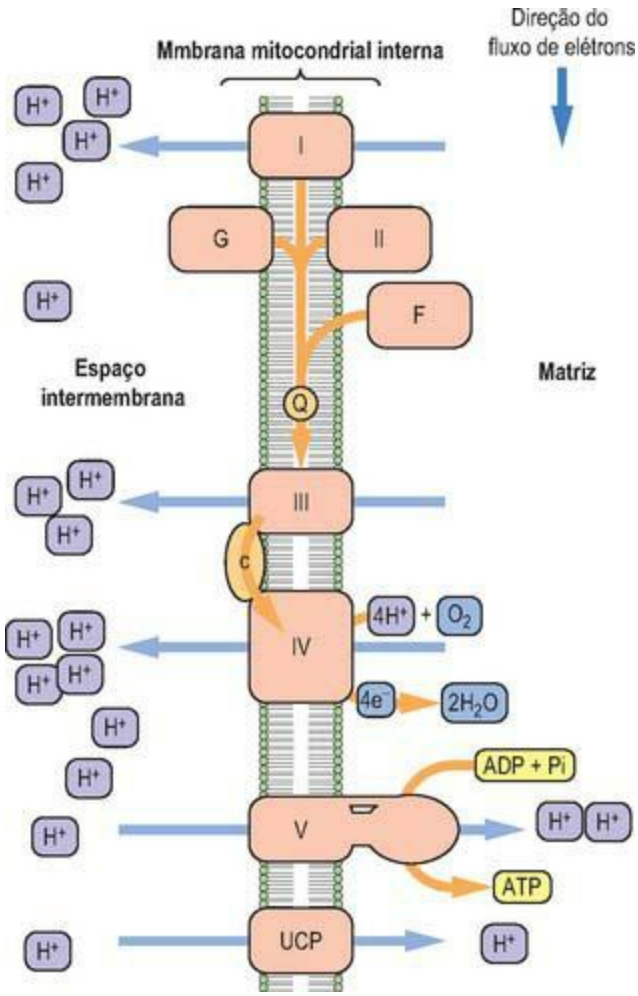


Fig. 9.5 **Uma seção da membrana interna mitocondrial com o sistema de transporte de elétrons e a ATP sintase.** I, complexo I; II, complexo II; III, complexo III; IV, complexo IV; V, complexo V ou ATP sintase; G, glicerol 3-fosfato desidrogenase; F, acil CoA desidrogenase; Q, ubiquinona; c, citocromo *c*; UCP, proteína desacopladora.

Os elétrons são dirigidos na cadeia de transporte de elétrons por várias flavoproteínas. Destas,

quatro são as espécies principais, incluindo o complexo I, que contém FMN e três que incluem o FAD. Todas estas vias reduzem a pequena e lipofílica molécula de ubiquinona (Q ou coenzima Q_{10}), no início da via comum de transporte de elétrons, consistindo de Q, complexo III, citocromo *c* e complexo IV.

$$\text{Flavoproteína}_{(\text{reduzida})} + Q \rightarrow \text{Flavoproteína}_{(\text{oxidada})} + QH_2$$

Os prótons são bombeados da matriz para dentro do espaço intermembrana pelos complexos I, III e IV. O oxigênio (O_2) é o aceptor final de elétron no final da cadeia e é reduzido em duas moléculas de água pela transferência de quatro elétrons a partir do complexo IV.

A eficiência da fosforilação oxidativa é medida dividindo-se a quantidade de fosfato incorporado ao ADP pela quantidade de oxigênio atômico reduzido. Um átomo de oxigênio é reduzido por dois elétrons (um par de elétrons).

$$ADP + Pi + \tfrac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow ATP + H_2O$$

Para cada par de elétrons transportados através dos complexos I, III e IV, um número suficiente de prótons é bombeado por cada complexo para a síntese de aproximadamente um mol de ATP. Se o transporte de elétrons começa com um par de elétrons do NADH, aproximadamente 2,5 mol de ATP são sintetizados, enquanto um par de elétrons de qualquer das outras três flavoproteínas, contendo $FADH_2$, produz cerca de 1,5 mol de ATP, porque a capacidade de bombeamento de elétrons do complexo I é deixada de lado.

Flavoproteínas contêm grupos prostéticos FAD ou FMN

O complexo I, também chamado de NADH-Q redutase ou NADH desidrogenase, é uma flavoproteína contendo FMN. Esse complexo oxida o NADH mitocondrial e transfere elétrons através de complexos de FMN e de ferro-enxofre (FeS) para a ubiquinona, fornecendo energia suficiente para bombear quatro prótons da matriz na reação:

$$NADH + Q + 5H^+_{matriz} \rightarrow NAD^+ + QH_2 + 4H^+_{espaço\ intermembrana}$$

Três outras flavoproteínas transferem elétrons de substratos oxidados *via* $FADH_2$ para a ubiquinona (Q) (Fig. 9.5):

- succinato-Q redutase (complexo II ou succinato desidrogenase do ciclo TCA) (Cap. 14) oxida o succinato para fumarato e reduz FAD a $FADH_2$

- glicerol-3-fosfato-Q redutase, uma parte da lançadeira do glicerol-3-P (ver adiante), oxida o glicerol-3-P a fosfato de di-hidroxiacetona (DHAP) e reduz FAD a $FADH_2$

- acil CoA desidrogenase catalisa o primeiro passo na oxidação mitocondrial de ácidos graxos e também produz $FADH_2$.

DEFICIÊNCIA DE FERRO LEVA A ANEMIA

Uma mulher de 45 anos de idade se queixa de cansaço e aparece pálida. Ela é vegetariana e está apresentando um fluxo menstrual mensal que é intenso e prolongado. Seu hematócrito é de 0,32 (a referência varia de 0,41-0,46) e sua concentração de hemoglobina é de 9 g/L (variação normal 120-160 g/L; 12-16 g/dL).

Comentário. A anemia por deficiência de ferro é um problema nutricional comum e é especialmente comum em mulheres que menstruam e em grávidas devido à necessidade aumentada de ferro da dieta. Os homens necessitam de cerca de 1 mg de ferro/dia, as mulheres que menstruam necessitam de cerca de 2 mg/dia, e as gestantes, de 3 mg/dia. O ferro é necessário para se manter quantidades normais de hemoglobina, citocromos e complexos ferro-enxofre que são fundamentais para o transporte de oxigênio e metabolismo energético. Todos esses processos ficam prejudicados pela deficiência de ferro. O ferro do heme, que é encontrado em carnes, é absorvido muito mais eficientemente do que o ferro inorgânico tal como encontrado em gema de ovo, vegetais e nozes.

UMA RARA DEFICIÊNCIA DE Q_{10}

Um menino de 4 anos de idade apresentou-se com convulsões, fraqueza muscular progressiva e encefalopatia. O acúmulo de lactato, um produto do metabolismo anaeróbico da glicose no líquido cefalorraquidiano (LCR) sugeriu um defeito no metabolismo oxidativo mitocondrial. Mitocôndrias de músculo foram isoladas para estudo. As atividades individuais dos complexos I, II, III e IV estavam

normais, mas as atividades combinadas de I + III e de II + III estavam significantemente diminuídas. O tratamento com coenzima Q_{10} melhorou a fraqueza muscular, mas não a encefalopatia.

Comentário Fraqueza muscular grave, encefalopatia, ou ambas, podem ser causadas pela chamada miopatia mitocondrial por defeitos mitocondriais envolvendo o sistema de transporte de elétrons. O aumento do lactato no LCR sugere um defeito na fosforilação oxidativa. As atividades diminuídas dos complexos I + III e de II + III sugerem uma deficiência de coenzima Q_{10}, que foi confirmada por medidas diretas.

COMPLEXOS FERRO-ENXOFRE

Complexos ferro-enxofre participam em reações redox

O ferro é um importante constituinte das hemeproteínas, tais como a hemoglobina, os citocromos e a catalase, mas está também associado em complexos ferro-enxofre (FeS) ou a não hemeproteínas que funcionam como transportadoras de elétrons no sistema de transporte de elétrons mitocondrial. Os tipos Fe_2S_2 e F_4S_4 são mostrados na Figura 9.6. Em cada caso, o centro ferro-enxofre é ligado a um peptídeo através de resíduos de cisteína. Os complexos FeS sofrem reações de redução de um elétron que induzem distorções reversíveis e relaxamento. Diz-se que a energia redox é conservada na 'energia conformacional' da proteína. (Cap. 37)

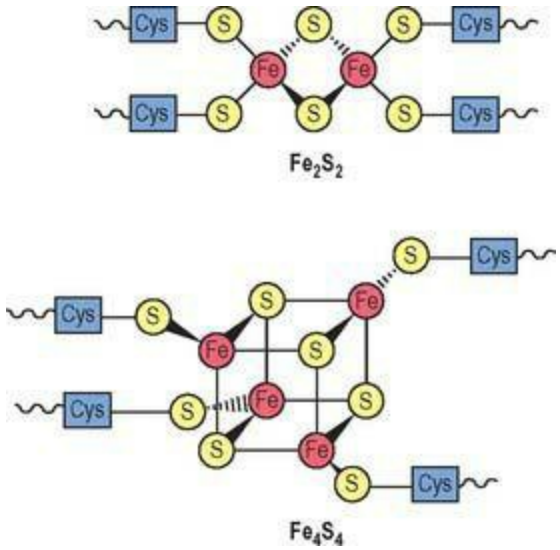


Fig. 9.6 Complexos ferro-enxofre. Cys, cisteína.

Tanto o FMN quanto o FAD contêm a vitamina hidrossolúvel riboflavina. Uma deficiência de riboflavina na dieta pode prejudicar gravemente as funções destas e de outras flavoproteínas.

TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS DO NADH PARA A MITOCÀNDRIA

Lançadeiras de elétrons

O NADH é produzido no citosol durante o metabolismo de carboidratos. O NADH não pode atravessar a membrana mitocondrial interna e, desta forma, não pode ser oxidado pelo sistema de transporte de elétrons. Duas lançadeiras redox permitem a oxidação do NADH citosólico sem a sua transferência para o interior da mitocôndria. A propriedade característica dessas lançadeiras é que são potencializadas por isoformas, citoplasmática e mitocondrial, da mesma enzima. A lançadeira de glicerol-3-fosfato é a mais simples das duas (Fig. 9.7A). Esta transfere os elétrons do NADH do citoplasma para a mitocôndria, reduzindo FAD a $FADH_2$. A glicerol-3-fosfato desidrogenase catalisa a redução da DHAP com NADH para glicerol-3-P. A glicerol-3-fosfato citoplasmática é reoxidada a DHAP por uma outra isoforma da glicerol-3-fosfato na face externa da membrana mitocondrial interna; esta enzima é uma flavoproteína na qual o FAD é reduzido a $FADH_2$. Os elétrons são então transferidos para a via comum pela ubiquinona. O rendimento de ATP a partir do NADH por esta via é de aproximadamente 1,5 mol, em vez dos 2,5 mol disponíveis a partir do NADH mitocondrial através do complexo NADH-Q redutase (complexo I).

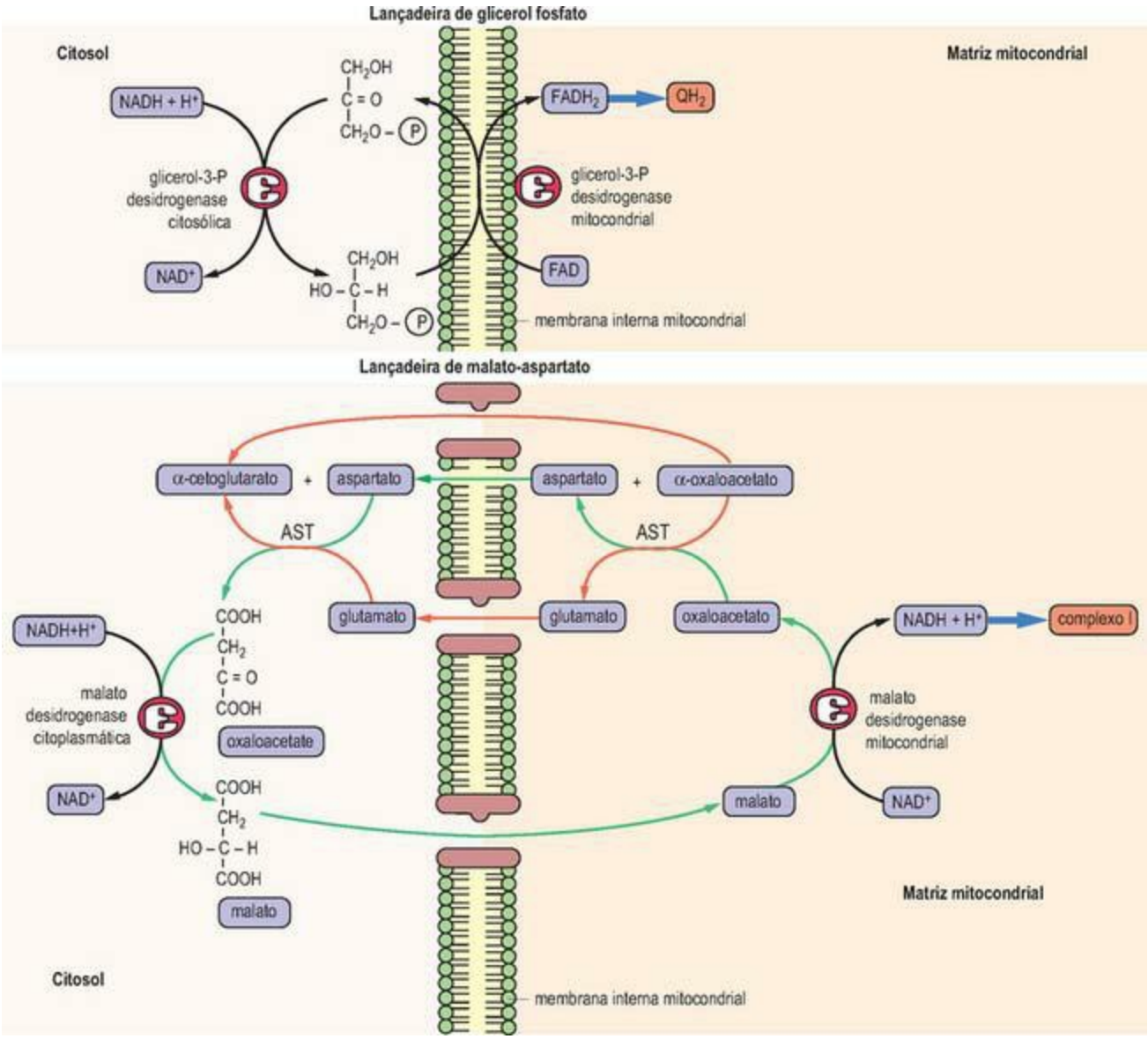


Fig. 9.7 Lançadeiras redox na membrana mitocondrial interna. (Alto) A lançadeira glicerol fosfato. (Baixo) As lançadeiras de

malato-aspartato. AST aspartato aminotransferase

Muitas células, por exemplo musculo esqueléticas, utilizam a lançadeira de glicerol-3-fosfato, mas o coração e o fígado dependem da lançadeira de malato-aspartato (Fig. 9.7B), que produz 2,5 mol de ATP por mol de NADH. Esta lançadeira é mais complicada, uma vez que o substrato, o malato, pode atravessar a membrana mitocondrial interna, mas a membrana é impermeável ao produto, oxalacetato – não há um transportador de oxalacetato. A troca é então alcançada pela interconversão entre α-ceto- e α-aminoácidos, envolvendo glutamato citoplasmático e mitocondrial e α-cetoglutarato, e isoenzimas da glutamato-oxalacetato transaminase (aspartase aminotransferase).

A ubiquinona (coenzima Q10) transfere elétrons para o complexo III

A ubiquinona é assim chamada porque é ubíqua em virtualmente todos os sistemas vivos. Esta é um pequeno composto lipídio-solúvel encontrado na membrana mitocondrial interna de mitocôndrias animais e de plantas e na membrana plasmática de bactérias. A forma primária da ubiquinona de mamíferos contém uma cadeia lateral de 10 unidades de isopreno e é frequentemente chamada de CoQ_{10}. Esta se difunde no interior da membrana interna, recebe elétrons das quatro principais flavoproteínas mitocondriais e os transfere para o complexo III (QH_2-citocromo *c* redutase) A ubiquinona pode carrear tanto um quanto dois elétrons (Fig. 9.8) e considera-se ser a maior fonte de radicais superóxidos na célula (Cap. 37).

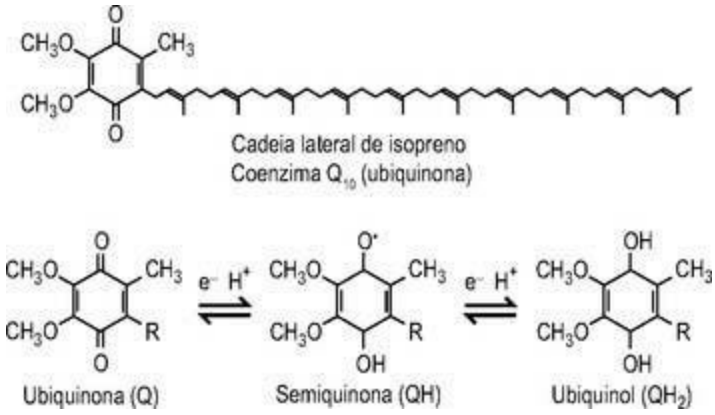


Fig. 9.8 Coenzima Q_{10}, ou ubiquinona recebe um ou dois elétrons, transferindo-os das flavoproteínas para o complexo III. A forma semiquinona é um radical livre.

Complexo III – citocromo c redutase

Este complexo enzimático, também conhecido como ubiquinona-citocromo *c* redutase ou QH_2 - citocromo *c* redutase, oxida ubiquinona e reduz o citocromo *c*. A ubiquinona reduzida converge os elétrons que recebe a partir das flavoproteínas mitocondriais e os transfere para o complexo III. Os elétrons da ubiquinona são transferidos através de duas espécies de citocromo *b*, para um centro Fe-S, para o citocromo c_1 e, finalmente, para o citocromo *c*. O transporte de dois elétrons para o citocromo *c* produz suficiente variação de energia livre e bombeamento de prótons para sintetizar cerca de um mol de ATP. A reação geral é:

$$QH_2 + 2\text{cit } c_{\text{oxidado}} + 2H^+_{\text{matriz}} \rightarrow$$

$$2Q + 2\text{cit } c_{\text{reduzido}} + 4H^+_{\text{espaço intermembrana}}$$

Quatro prótons são bombeados durante esta reação, dois a partir da ubiquinona totalmente reduzida e dois a partir da matriz.

CITOCROMOS

Os citocromos, encontrados em mitocôndria e retículo endoplasmático, são proteínas que contêm grupos heme, mas que não estão envolvidas no transporte de oxigênio (Fig. 9.9). A estrutura central desses grupos heme é um anel tetrapirrólico similar ao da hemoglobina, algumas vezes diferindo somente na composição das cadeias laterais. O grupo heme dos citocromos *b* e c_1 é conhecido como ferro protoporfirina IX e é o mesmo heme que é encontrado na hemoglobina, mioglobina e catalase. O citocromo *c* contém heme C que é ligado covalentemente à proteína através de resíduos de cisteína. Os citocromos *a* e a_3 contêm heme A que, em comum com a ubiquinona, contêm uma cadeia lateral de isopreno que é hidrofóbica. Na hemoglobina e mioglobina o heme deve permanecer no estado ferroso (Fe^{2+}); nos citocromos, o íon ferro é reduzido e oxidado, reversivelmente, entre os estados Fe^{2+} e Fe^{3+} à medida que os elétrons são lançados de uma proteína para a outra.

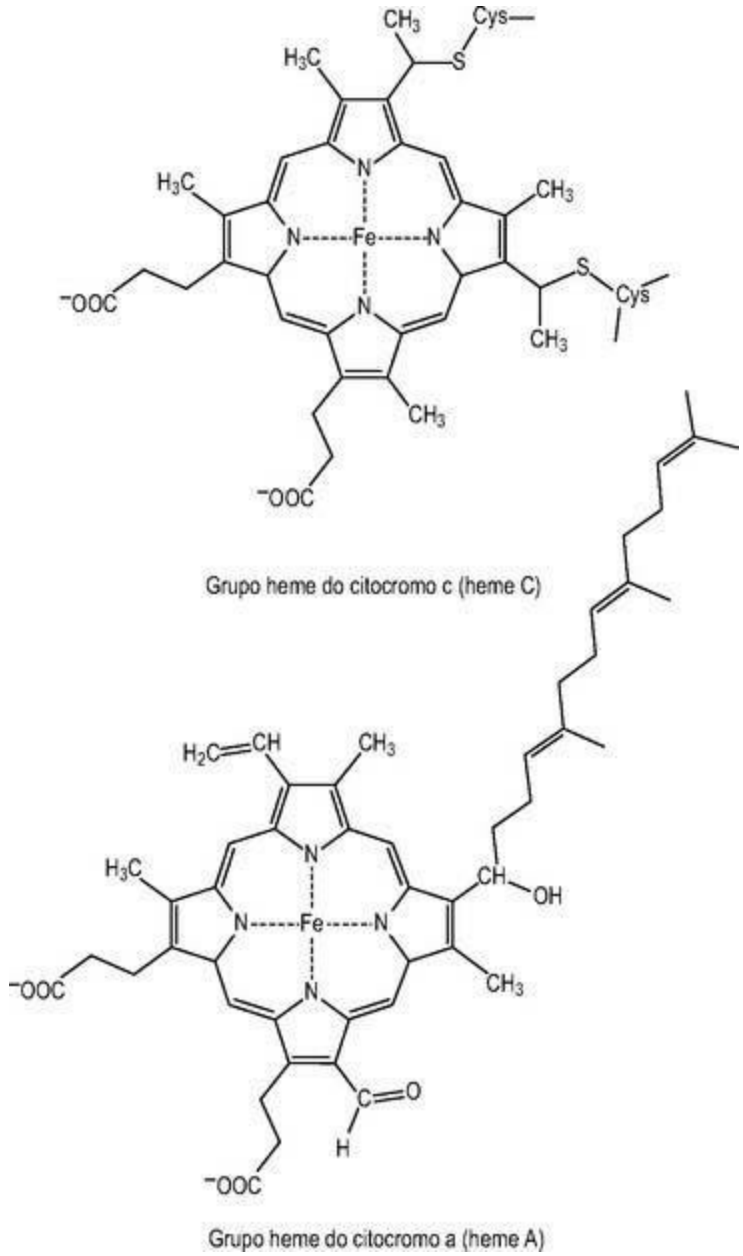


Fig. 9.9 Variações na estrutura do heme entre os citocromos. Os citocromos são proteínas que contêm grupos heme.

Citocromo c

O citocromo *c*, uma hemeproteína pequena frouxamente ligada à superfície externa da membrana interna, lança elétrons do complexo III para o complexo IV. Cada citocromo *c* carreia somente um elétron; então, a redução de O_2 para 2 H_2O pelo complexo IV necessita de quatro moléculas de citocromo *c* reduzido. A ligação do citocromo *c* aos complexos III e IV é bastante eletrostática, envolvendo numerosos resíduos de lisina na superfície proteica. A redução do ferricitocromo *c* (Fe^{3+}) para ferrocitocromo *c* (Fe^{2+}) pelo citocromo c_1 leva à mudança na estrutura tridimensional, distribuição de cargas e momento dipolo da proteína, promovendo a transferência de elétrons para o citocromo *a* do complexo IV (Fig. 9.5). Sob certas condições (em baixos potenciais de membrana), o citocromo *c* pode ser liberado do interior da membrana mitocondrial e escapar para o citosol, induzindo apoptose (morte celular).

DEFICIÊNCIA DE COBRE EM RECÉM-NASCIDOS

O cobre é necessário em quantidades traço para a nutrição humana ótima. Embora a deficiência de cobre em adultos seja rara, recém-natos prematuros têm baixas reservas de cobre e podem sofrer por conta desta deficiência. Esta pode levar à anemia e cardiopatia porque compromete a síntese de quantidades adequadas de citocromo *c* oxidase e de outras enzimas, incluindo-se várias cuproenzimas envolvidas na síntese de heme.

Comentário. A deficiência de cobre pode impedir a produção de ATP pela inibição da reação terminal da cadeia de transporte de elétrons, levando a patologias no coração, onde a demanda de energia é alta. Fórmulas dietéticas para crianças prematuras devem conter cobre em concentrações adequadas; o leite de vaca isoladamente é insuficiente por ser pobre em cobre.

Complexo IV

O complexo IV, conhecido como citocromo *c* oxidase ou citocromo oxidase, existe como um dímero na MMI. Este oxida o citocromo *c* móvel, e conduz elétrons através dos citocromos *a* e a_3, finalmente reduzindo o oxigênio a água em uma reação de transferência de quatro elétrons (Fig. 9.10). O cobre é um componente comum desta e de outras enzimas. Os venenos de baixo peso molecular, como azida, cianeto e monóxido de carbono, se ligam ao grupo heme do citocromo a_3 no citocromo *c* oxidase e inibem o complexo IV. Em comum com os complexos I e III, o complexo do citocromo oxidase bombeia prótons para fora da mitocôndria, contribuindo para a síntese de cerca de uma molécula de ATP por par de elétrons transferidos para o oxigênio. O número real de prótons bombeados é quatro. Adicionalmente, outros quatro são necessários na redução de O_2 para água. A reação total catalisada pelo complexo IV é:

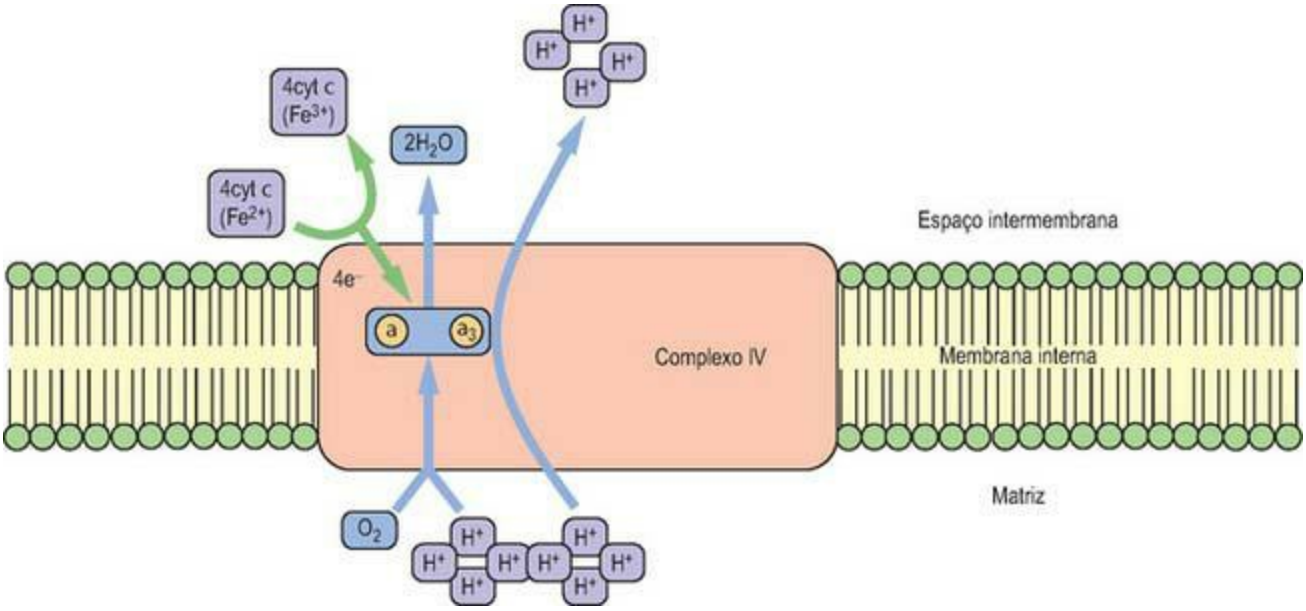


Fig. 9.10 Complexo IV. O complexo IV utiliza quatro elétrons do citocromo *c* e oito prótons da matriz. Os quatro prótons e elétrons reduzem o oxigênio a água. Quatro prótons adicionais são bombeados para fora da matriz. O complexo IV é regulado alostericamente pelo ATP, por fosforilação/desfosforilação reversível e pelo hormônio tireoideano (T_2 ou di-iodotironina). *a*, citocromo *a*; a_3, citocromo a_3.

$$4\text{cit c}_{\text{reduzido}} + 4H^+_{(\text{matriz})} + O_2 \rightarrow 4\text{cit c}_{\text{oxidado}} + 2\,H_2O$$

SÍNTESE DE ADENOSINA TRIFOSFATO – A HIPÒTESE QUIMIOSTÁTICA

De acordo com a hipótese quimiostática, a mitocôndria produz ATP utilizando a energia livre do gradiente de prótons gerado durante a oxidação do NADH e do $FADH_2$. Esta energia é descrita como uma força próton motriz, um gradiente eletroquímico criado pelo gradiente de concentração de prótons e um desequilíbrio de carga (de positividade externa) ao longo da membrana mitocondrial interna. Para operar, é necessário um sistema na membrana interna que seja impermeável aos prótons, exceto através da ATP sintase ou outros complexos, de uma forma regulada. Quando os prótons são bombeados para fora da matriz, o espaço intermembranas se torna mais ácido e mais positivamente carregado do que a matriz.

O complexo ATP sintase (complexo V) é um exemplo de catálise rotacional

Revestindo a face interna da matriz da membrana interna de cada mitocôndria estão milhares de cópias do complexo ATP sintase, também chamado de complexo V ou F_0F_1-ATP sintase (F = fator de acoplamento; veja inibidores da ATP sintase, adiante). A ATP sintase é também chamada de ATPase porque pode hidrolisar ATP. A ATP sintase consiste de dois complexos principais (Fig. 9.11). O componente de membrana interna, denominado F_0, é o motor impulsionado por prótons com a estequiometria de a, b_2 e $c_{10\text{-}14}$. As subunidades c formam o anel c, que gira no sentido horário em resposta ao fluxo de prótons através do complexo. Desde que as subunidades γ e ε são ligadas ao anel c, estas giram com este, induzindo grandes mudanças conformacionais nos três dímeros αβ. As duas β proteínas imobilizam o segundo complexo (F_1-ATP sintase).

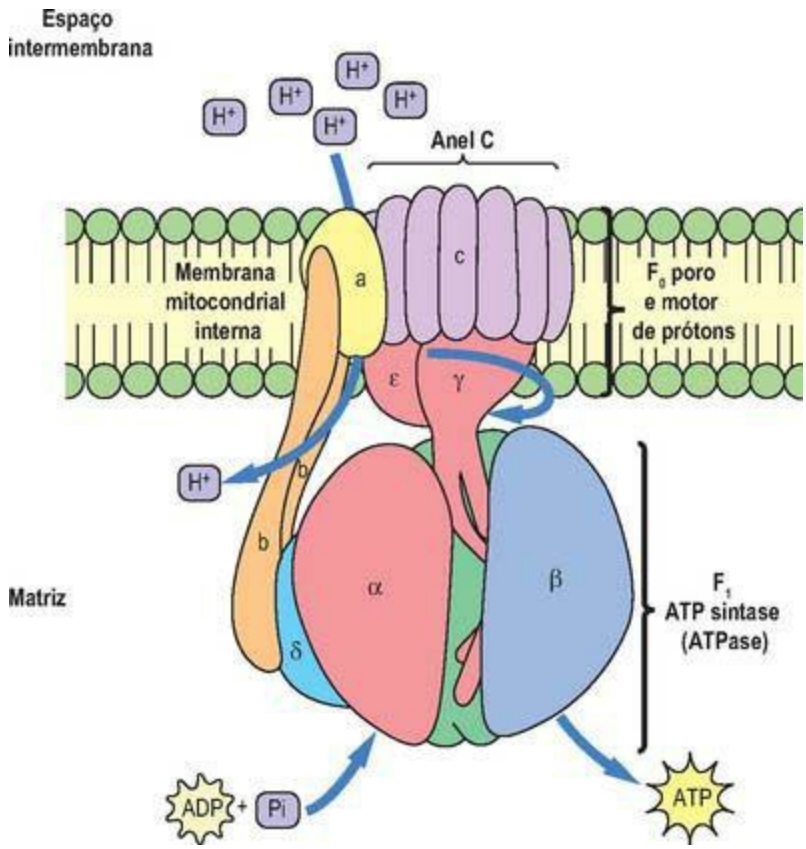


Fig. 9.11 O complexo da ATP sintase. O complexo da ATP sintase consiste de um motor (F_0) e gerador (F_1). O poro de prótons

envolve o anel *c* e a proteína *a*. O componente giratório é a subunidadeγ, que é ligada à subunidade ε e ao anel *c*. O componente estacionário é a unidade hexamérica $\alpha_3\beta_3$, que é ajustada pelas proteínas δ, *b* e *a*.

F_1 tem uma estequiometria de α_3, β_3, γ, δ, ε. A maior parte de F_1 consiste de três dímeros $\alpha\beta$ arranjados como gomos de uma laranja, com a atividade catalítica localizada na subunidade β. Cada rotação de 120° de rotação da subunidade γ induz alterações conformacionais nas subunidades de dímeros $\alpha\beta$ de tal forma que os sítios de ligação a nucleotídeos se alternam entre três estados: o primeiro liga ADP e Pi, o segundo sintetiza ATP e o terceiro libera ATP, de forma que a cada giro completo são produzidos três ATP. Este é conhecido como um mecanismo de mudança de ligação (Fig. 9.12). Surpreendentemente, a energia livre próton-motriz utilizada pela ATP sintase não é propriamente para a síntese do ATP, mas para sua liberação; quando o gradiente de prótons é muito baixo para permitir a liberação do ATP, o ATP permanece preso à ATP sintase e cessa a síntese de ATP adicional. O ADP e o Pi são ligados ao complexo logo que o ATP seja liberado. Os dímeros $\alpha\beta$ são assimétricos porque cada um está em uma configuração diferente a cada dado momento. Este complexo é um motor impulsionado por prótons e é um exemplo de catálise giratória. Cerca de três prótons são necessários para a síntese de cada ATP. Este complexo atua independentemente da cadeia de transporte de elétrons: a adição de um ácido fraco, como o ácido acético, a uma suspensão de mitocôndrias isoladas é suficiente para induzir a biossíntese de ATP *in vitro*.

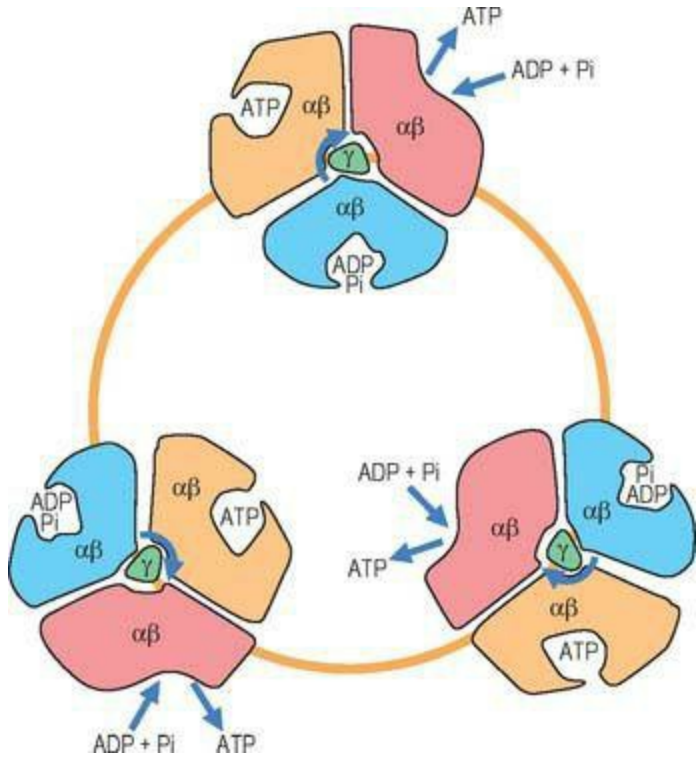


Fig. 9.12 Mecanismo de mudança de ligação da ATP sintase. Potencializado por prótons, o giro da subunidade γ da ATP sintase induz alterações conformacionais simultâneas em todos os três dímeros $\alpha\beta$. Cada giro de 120° resulta em ejeção de um ATP, ligação de ADP e Pi, e síntese de ATP.

Razões P:O

A razão P:O é a medida do número de fosfatos de alta energia (ou seja, a quantidade de ATP) sintetizado por átomo de oxigênio (1/2 O_2) consumido, ou por mol de água produzido. A razão P:O pode ser calculada a partir dos mol de ADP utilizados para sintetizar ATP e os átomos de oxigênio captados pela mitocôndria. Por exemplo, se 2 mmol de ADP são convertidos a ATP e 0,5 mmol de oxigênio (1,0 miliátomo de oxigênio) é captado, a razão P:O é 2,0. Como discutido anteriormente, o rendimento teórico de ATP por mol de NADH é de cerca de sete mol; entretanto, pela medida real utilizando-se mitocôndrias isoladas, o índice P:O para a oxidação de metabólitos que produzem NADH é de cerca de 2,5 e a razão para aqueles que produzem $FADH_2$ é de 1,5. O restante de energia disponível da oxidação de NADH e $FADH_2$ é liberado na forma de calor.

"O controle respiratório" é a dependência de captação de oxigênio pela mitocôndria na disponibilidade de ADP

Normalmente, a oxidação e a fosforilação estão firmemente acopladas; os substratos são oxidados, elétrons são transportados, e o oxigênio é consumido somente quando a síntese de ATP é necessária (respiração acoplada). Então, a mitocôndria em repouso consome oxigênio em baixa velocidade, que podem ser grandemente estimulado pela adição de ADP (Fig. 9.13). O ADP é captado pela mitocôndria e estimula a ATP sintase, que diminui o gradiente de prótons. A respiração aumenta porque as bombas de prótons são estimuladas a restabelecer o gradiente de prótons. Quando o ADP é depletado, a síntese de ATP cessa e a respiração retorna ao nível normal. O consumo de oxigênio decresce ao nível original quando a concentração de ADP é depletada e a síntese de ATP termina.

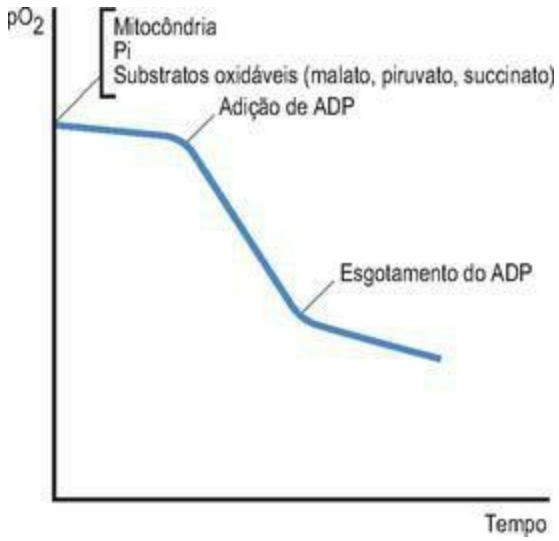


Fig. 9.13 Efeito do ADP na captação de oxigênio por mitocôndrias isoladas. Isto pode ser estudado em sistemas isolados (selados) com um eletrodo de oxigênio e um dispositivo de registro. O gráfico mostra um registro típico de consumo de oxigênio (pO_2, pressão parcial de oxigênio) por mitocôndrias normais com a introdução de ADP.

A mitocôndria pode ser parcialmente desacoplada se a membrana interna perde sua integridade. Diz-se estarem "vazadas" porque os prótons podem se difundir através da membrana interna sem envolver a ATP sintase. Isto ocorre se mitocôndrias isoladas são tratadas ou mantidas durante um

certo tempo com detergentes fracos que rompem a membrana interna. Tais mitocôndrias são denominadas “desacopladas”; a oxidação progride sem a produção de ATP e as mitocôndrias desacopladas perdem o controle respiratório porque os prótons bombeados pela cadeia respiratória escapam da ATPase e são devolvidos improdutivamente de volta ao interior da matriz. A razão P:O decresce sob tais condições.

O mecanismo de controle da respiração depende provavelmente da ligação de ADP e de Pi ao complexo de ATP sintase: na ausência de ADP e de Pi, os prótons não podem entrar na mitocôndria através desse complexo, e o consumo de oxigênio decresce acentuadamente porque as bombas de prótons não podem bombear prótons contra uma alta pressão de prótons contrária. Isto ocorre porque a energia livre das reações de transporte de elétrons é suficiente para gerar um gradiente de pH de duas unidades através da membrana. Se o gradiente de pH não pode ser desfeito para a produção de ATP, o gradiente de duas unidades de pH se mantém, e a bomba vai parando gradualmente até a interrupção total. A cadeia transportadora de elétrons torna-se reduzida e diminui a oxidação de substratos e o consumo de oxigênio. Uma pequena atividade física, com consumo de ATP e geração de ADP e de Pi, restaura os canais de ATPase, desfazendo o gradiente de prótons e ativando a cadeia de transporte de elétrons, o consumo de combustível e oxigênio. No corpo como um todo, nós respiramos mais rapidamente durante o exercício para fornecer o oxigênio necessário para um aumento da fosforilação oxidativa.

Desacopladores

Os desacopladores da fosforilação oxidativa dissipam o gradiente de prótons pelo transporte retrógrado destes prótons de volta para o interior da mitocôndria, sem passar pela ATP sintase. Os desacopladores estimulam a respiração porque o sistema realiza uma inútil tentativa de restabelecer o gradiente de prótons pela oxidação de mais combustível e bombeando mais prótons para fora da mitocôndria. Os desacopladores são tipicamente compostos hidrofóbicos e também ácidos ou bases fracas, com pK_a próximo ao pH 7. O clássico desacoplador, 2-4-dinitrofenol (DNP) (Fig. 9.14), é protonado no lado externo, mais ácido, da membrana mitocondrial interna. Devido a sua hidrofobicidade ele pode se difundir livremente através da membrana mitocondrial interna. Quando atinge o lado da matriz, encontra um pH mais básico e o próton é liberado, desfavorecendo o gradiente de pH efetivamente. Outros desacopladores incluem preservantes e agentes antimicrobianos como o pentaclorofenol e o *p*-cresol.

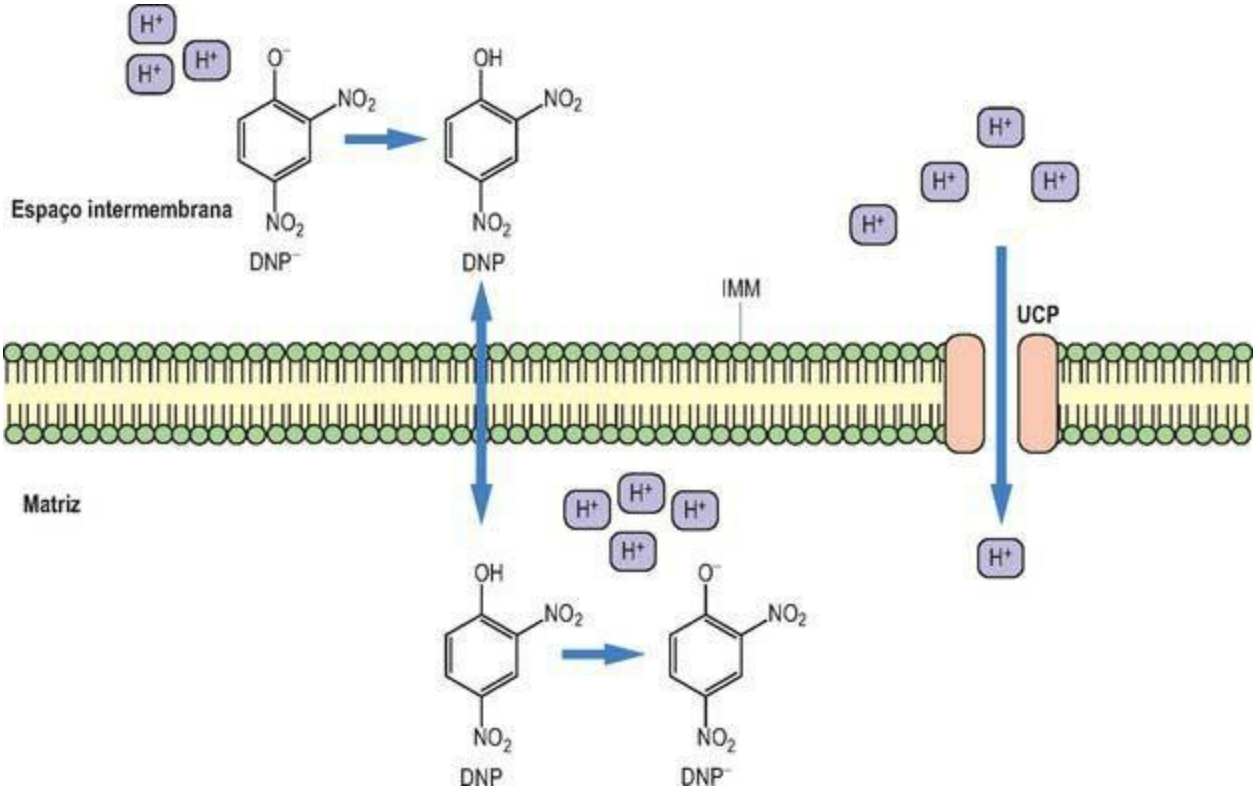


Fig. 9.14 Transporte de prótons por desacopladores. Os desacopladores transportam prótons para o interior da mitocôndria, dissipando o gradiente de prótons. O DNP é exemplo de desacoplador exógeno. As proteínas desacopladoras (UCP) são desacopladores endógenos na MMI e são regulados por hormônios. O gradiente consistindo de prótons e de outros fatores constitui o potencial mitocondrial de membrana (PMM), que é expressado em milivolts (mV). DNP, 2,4-dinitrofenol; MIM, membrana mitocondrial interna.

Proteínas desacopladoras (UCP)

De acordo com a hipótese quimiostática, a membrana mitocondrial interna é topologicamente fechada. Entretanto, já há muito tempo se sabe que os prótons são transportados para dentro da matriz a partir do espaço intermembrana por outras vias que não o complexo da ATP sintase e transportadores de membrana interna. Atualmente, considera-se que grande parte do TMB é principalmente devido a componentes de membrana interna chamados de proteínas desacopladoras (UCP). A primeira a ser descoberta foi a proteína desacopladora 1 (UCP-1), anteriormente conhecida como termogenina, que é encontrada exclusivamente no tecido adiposo marrom. O tecido adiposo marrom é abundante em recém-natos e em alguns mamíferos adultos e é marrom por seu alto conteúdo de mitocôndrias. Nos humanos, o tecido adiposo marrom é abundante em lactentes, mas gradualmente diminui e é raramente detectado em adultos. A única função da UCP-1 é o fornecimento de calor durante o estresse do frio em animais jovens e em alguns adultos. Isto se realiza pelo desacoplamento do gradiente de prótons, desta forma gerando calor (termogênese) em vez de ATP. As proteínas desacopladoras são expressas em altos níveis em animais que hibernam, permitindo-os manter a temperatura corporal sem movimento ou exercício.

ENVENENAMENTO POR 2,4-DINITROFENOL

Uma mulher de 25 anos de idade, inconsciente, é levada à sala de emergência por seu namorado porque após ter ingerido duas doses de "pílulas para emagrecer" ela queixava-se de dor de cabeça, febre, dor no peito, sudorese intensa e fraqueza. Os achados iniciais foram: temperatura retal de 40,8°C (105,5°F), pulso de 151 batimentos por minuto, frequência respiratória de 56 incursões por minuto, pressão sanguínea de 40/10. Em 15 minutos ela morreu e não pôde ser ressuscitada. Após o óbito, o *rigor mortis* se estabeleceu em 10 minutos e sua temperatura subiu para 46°C (115°F) nos 10 minutos seguintes. Soube-se que ela era uma fisiculturista que tomava cápsulas para "perda de peso" adquiridas de um amigo porque ela queria ter um corpo magro para uma apresentação. Entre seus objetos de uso pessoal estava um frasco contendo cápsulas que se comprovou conterem 2,4-dinitrofenol.

Comentário. O dinitrofenol (DNP) é um desacoplador da fosforilação oxidativa (Fig. 9.14). Foi descoberto, durante a Primeira Guerra Mundial, como um indutor de perda de peso, quando foi noticiado que produtores de munição franceses que eram expostos ao dinitrofenol durante a síntese de dinamite (trinitrotolueno, TNT) perdiam peso rapidamente. Na década de 1930 o composto era prescrito por médicos para a perda de peso e era, também, disponível sem receita médica, mas devido aos graves efeitos colaterais apresentados pelas pessoas, como cataratas, cegueira, lesões renais e hepáticas e morte, foi proibido para o uso médico nos Estados Unidos, após uma investigação do Congresso. O caso relatado acima foi adaptado dentre os relatados em audiências. O dinitrofenol é de emprego industrial corrente na produção de corantes, explosivos, herbicidas, inseticidas e preservantes de madeira. O DNP mata bactérias e fungos pelo desacoplamento à fosforilação. Infelizmente, o DNP ressurgiu como um produto ilegal para perda de peso. Este aumenta radicalmente o consumo de oxigênio e de combustíveis metabólicos e, praticamente, toda a energia metabólica é perdida como calor. As células morrem, tanto devido à elevação de temperatura quanto

pela carência de ATP.

Quatro outras proteínas desacopladoras são expressas a partir do genoma humano: UCP-2, UCP-3, UCP-4 e UCP-5. Enquanto a UCP-1 é exclusiva de tecido adiposo marrom, a expressão de UCP-2 é de caráter ubíquo, e a UCP-3 é principalmente expressa no músculo esquelético, e a UCP-4 e a UCP-5 são expressas no cérebro. Exceto para a UCP-1, as funções fisiológicas dessas proteínas não estão bem entendidas, mas podem ser de alto significado na nossa compreensão das questões de saúde como o diabetes, obesidade, câncer, doenças da tireoide e envelhecimento. Como desacopladoras elas têm sido relacionadas a numerosas funções fundamentais. Por exemplo, há forte evidência de que a obesidade induz a síntese de UCP-2 em células β do pâncreas. Isto pode ter um papel na disfunção das células β encontradas no diabetes tipo 2, uma vez que ela diminui a concentração intracelular de ATP, que é necessária para a secreção de insulina. Mostrou-se que o hormônio tireoidiano (T_3) estimula a termogênese em ratos promovendo a síntese de UCP-3 em músculo esquelético. Parece claro que a febre que é induzida por organismos infectantes seja provavelmente devida ao desacoplamento por UCPs, mas o mecanismo é desconhecido. O sistema de UCPs é importante na regulação de potenciais de membrana. Por exemplo, UCP-2 está superexpressa por altos potenciais de membrana para diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio (Cap. 37).

INIBIDORES DO METABOLISMO OXIDATIVO

Inibidores do sistema de transporte de elétrons

Os inibidores do transporte de elétrons inibem seletivamente os complexos I, III ou IV, interrompendo o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória. Isto impede o bombeamento de elétrons, a síntese de ATP e a captação de oxigênio. Vários inibidores são venenos facilmente disponíveis que podem ser encontrados na prática médica. é digno de nota que defeitos genéticos de componentes da cadeia de elétrons podem mimetizar o efeito desses inibidores.

Rotenona inibe o complexo I (NADH-Q redutase)

A rotenona, um inseticida comum, e alguns barbitúricos (por exemplo, o amital) inibem o complexo I. Já que o malato e o lactato são oxidados pelo NAD^+, a oxidação destes será diminuída pela rotenona. Entretanto, os substratos que produzem $FADH_2$ podem, ainda, ser oxidados porque o complexo I é ignorado e os elétrons são doados à ubiquinona. A adição de ADP a uma suspensão de mitocôndrias suplementadas com malato e fosfato (Fig. 9.15) estimula acentuadamente a captação de oxigênio à medida que ocorre a síntese de ATP. A captação de oxigênio é acentuadamente inibida pela rotenona, mas quando succinato é adicionado à síntese de ATP e o consumo de oxigênio são restaurados até que o suprimento de ADP seja exaurido. A inibição do complexo I pela rotenona causa a redução de todos os componentes anteriores ao ponto de inibição, porque estes não podem ser oxidados, enquanto aqueles após o ponto de inibição são totalmente oxidados. Este ponto é conhecido como uma encruzilhada e pode ser determinado espectofotometricamente porque a luz absorvida pelos componentes da cadeia respiratória muda de acordo com o estado redox. Tais análises foram empregadas para definir a sequência de componentes na cadeia respiratória.

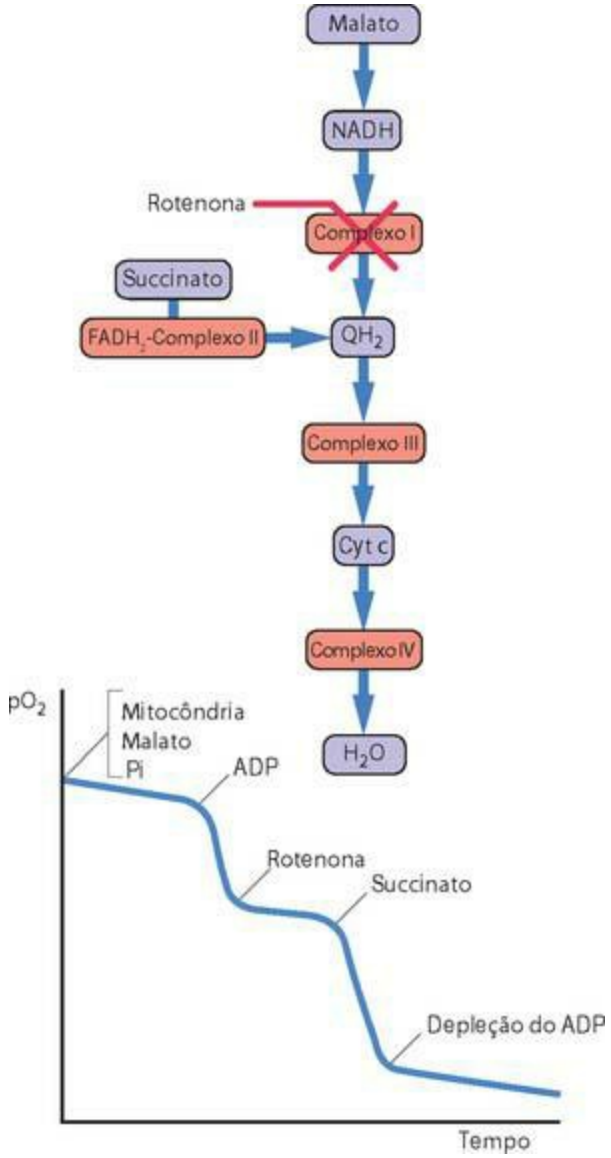


Fig. 9.15 Inibição do complexo I. Inibidores como a rotenona retardam a captação de oxigênio pela mitocôndria quando substratos produtores de NADH vão sendo oxidados.

Antimicina A inibe o complexo III (QH_2-citocromo c redutase)

A inibição do complexo III pela antimicina A previne a transferência, tanto do complexo I quanto das flavoproteínas contendo $FADH_2$ para o citocromo *c*. Nesse caso, os componentes anteriores ao complexo III se tornam totalmente reduzidos e os posteriores a este se tornam oxidados. A curva de captação de oxigênio (Fig. 9.16) mostra que a estimulação da respiração pelo ADP é inibida pela antimicina A, mas que a adição de succinato não reverte a inibição. O ácido ascórbico pode reduzir o citocromo *c*, e a adição de ácido ascórbico restabelece a respiração, ilustrando que o complexo IV não é afetado pela antimicina A.

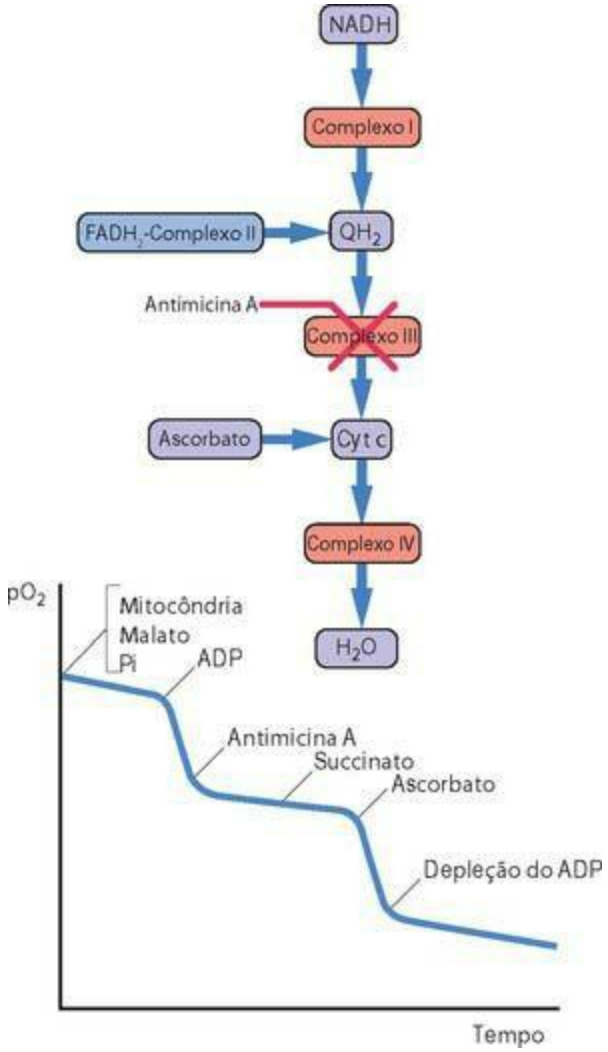


Fig. 9.16 Inibição do complexo III pela antimicina. A antimicina A inibe o complexo III, bloqueando a transferência de elétrons, tanto do complexo I e das flavoproteínas quanto do complexo II.

Cianeto e monóxido de carbono inibem o complexo IV

A azida (N_3^-), o cianeto (CN^-) e monóxido de carbono (CO) inibem o complexo IV (citocromo *c* oxidase) (Fig. 9.17). Como o complexo IV é o complexo terminal de transferência de elétrons, sua inibição não pode ser desviada. Todos os componentes anteriores ao complexo IV se tornam reduzidos, o oxigênio não pode ser reduzido, nenhum dos complexos pode bombear prótons e o ATP não é sintetizado. Os desacopladores como o DNP não têm efeito porque não há nenhum gradiente de prótons. O cianeto e o monóxido de carbono se ligam também à hemoglobina e esta não pode carrear oxigênio (Cap. 5). Nesses envenenamentos, estão prejudicados tanto a capacidade de transporte de oxigênio quanto a síntese de ATP. A administração de oxigênio é empregada para o tratamento de tais envenenamentos. é interessante que a azida sódica é a fonte de nitrogênio para *air bags* serem inflados; se esta for liberada acidentalmente pode trazer um problema ambiental, ou seja, não por explosão.

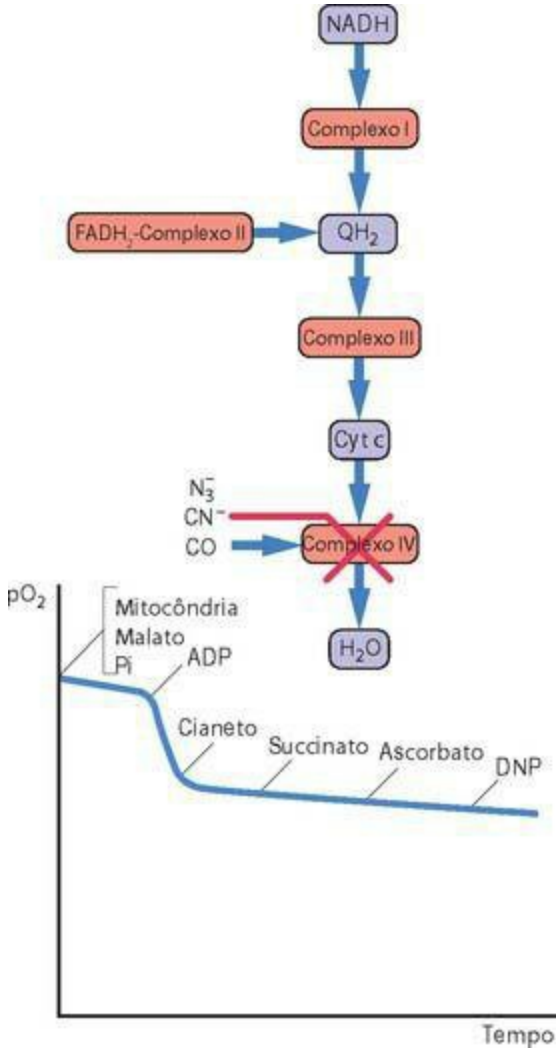


Fig. 9.17 Inibição do complexo IV. A inibição do complexo IV interrompe a transferência de elétrons, na etapa final do transporte de elétrons. Os elétrons não podem ser transferidos para o oxigênio, e a síntese de ATP é interrompida.

Inibidores da ATP sintase

A oligomicina inibe a respiração, mas, em contraste com os inibidores de transporte de elétrons, não é um inibidor direto do sistema de transporte de elétrons. Em vez disso, esta inibe o canal de prótons da ATP sintase. Isto causa o acúmulo de prótons fora da mitocôndria, uma vez que o sistema de bombeamento de prótons está ainda intacto, mas o canal de prótons está bloqueado. A adição do desacoplador DNP após a captação de oxigênio tendo sido inibida pela oligomicina ilustra este ponto: o DNP dissipa o gradiente de prótons e estimula a captação de oxigênio à medida que o sistema de transporte de elétrons tenta restabelecer o gradiente de prótons (Fig. 9.18).

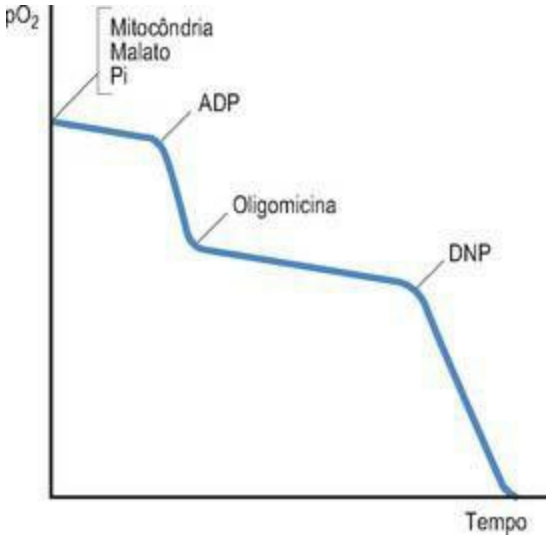


Fig. 9.18 Oligomicina inibe a captação de oxigênio. A oligomicina inibe a captação de oxigênio na síntese mitocondrial de ATP. A oligomicina inibe a ATP sintase e a captação de oxigênio em mitocôndria acoplada. Entretanto, o DNP estimula a captação de oxigênio após a inibição pela oligomicina, por desfazer o gradiente de prótons.

Inibidores da ADP-ATP translocase

A maioria do ATP é sintetizada na mitocôndria, mas utilizada no citosol para reações de síntese. O ATP recém-sintetizado na mitocôndria e o ADP citosólico gasto são trocados por uma ADP-ATP translocase, representando cerca de 10% da proteína no interior da membrana mitocondrial interna (Fig. 9.3). Esta translocase pode ser inibida por plantas incomuns e por toxinas de fungos, como o ácido bongkréquico e atractilosídeo. Seus efeitos são similares aos da oligomicina *in vitro* – o gradiente de prótons aumenta e o transporte de elétrons cessa, mas, assim como para oligomicina, a respiração pode ser reativada por desacopladores.



CIANETO E MONÓXIDO DE CARBONO SÃO VENENOS MITOCONDRIAIS

Tanto o cianeto quanto o monóxido de carbono se ligam à hemoglobina e inibem o transporte de oxigênio. Eles também inibem o transporte de elétrons e a produção de ATP.

Comentário. As células respondem ao envenenamento por cianeto e monóxido de carbono através da alteração para o metabolismo anaeróbico, resultando na acidose láctica e, finalmente, na morte, se não são tomadas medidas imediatas. O envenenamento por monóxido de carbono é tratado com oxigênio. Tanto no envenenamento pelo cianeto, quanto pelo monóxido de carbono, azul de metileno pode ser administrado: isto alivia a inibição do complexo IV pela recepção de elétrons do complexo III (citocromo *c* redutase), permitindo ao complexo I e ao complexo III bombear elétrons, de tal forma que o ATP pode continuar a ser sintetizado. O cianeto pode também ser convertido a um íon relativamente menos tóxico, o tiocianato, pela administração de tiossulfato.



ENCEFALOPATIA MITOCONDRIAL

Um adolescente de 16 anos de idade apresentava dor de cabeça, desmaios e perda de visão. Havia uma longa história de incapacidade para exercícios devido à fraqueza muscular. Ocorreram episódios de hemianopia e leve hemiparesia durando vários dias. A tia de sua mãe apresentou uma doença similar. O acúmulo de ácido láctico durante e após exercícios sugere um defeito no metabolismo oxidativo mitocondrial. As mitocôndrias musculares foram isoladas para estudo. A atividade respiratória do Complexo I estava reduzida. Foi identificada uma mutação pontual no DNA mitocondrial.

Comentário. Foi estabelecido o diagnóstico de uma miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios semelhantes a um AVC (MELAS). MELAS (encefalopatia mitocondrial) é um grupo de condições causadas por defeitos no processo de fosforilação oxidativa e é caracterizado por defeitos no processo pelo qual o NADH impulsiona elétrons ao longo da cadeia mitocondrial e gera ATP.

REGULAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

Controle respiratório e regulação por retroalimentação

O mais antigo e mais simples mecanismo de regulação de controle respiratório é realizado pelo suprimento de ADP. Este é fundamentado no fato de que o ADP quando é adicionado a mitocôndrias isoladas estimula a respiração e a síntese de ATP. Quando o ADP é totalmente convertido em ATP, a respiração retorna à velocidade inicial. A fosforilação oxidativa está também firmemente acoplada a outras vias fundamentais como a glicólise, a oxidação de ácidos graxos e ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Caps. 12, 14 e 15) através de mecanismos de retroalimentação. As proporções NADH/NAD e ATP/ADP retroalimentam enzimas-chave, tais como PKF-1, piruvato desidrogenase e isocitrato desidrogenase. Se, por exemplo, a fosforilação oxidativa é desativada por conta de alta concentração de ATP, tanto o NADH quanto o ATP serão retroalimentados negativamente em outras vias extramitocondriais, limitando o fluxo de combustível para a mitocôndria. Uma vez que a fosforilação oxidativa responde à oferta de $FADH_2$, NADH, ADP e Pi, assim como à razão ATP/ADP, a magnitude do potencial de membrana, desacopladores e fatores hormonais, seu modo de regulação é evidentemente complexo.

Regulação por modificação covalente e efetores alostéricos (ATP-ADP)

O principal alvo para a regulação da fosforilação oxidativa parece ser o complexo IV. Este é fosforilado em resposta à ação hormonal (Cap. 13) pela proteína quinase dependente de monofosfato cíclico de 3′5′-adenosina (*c*AMP) e desfosforilado por uma proteína fosfatase estimulada por Ca^{+}. A fosforilação favorece a regulação alostérica por ATP (razão ATP/ADP). Uma alta relação ATP/ADP inibe e uma relação baixa estimula a fosforilação oxidativa. Pensa-se que o complexo está normalmente fosforilado e inibido por ATP. Com níveis elevados de $^{Ca+}$, ou seja, no músculo durante exercício (Cap. 20) a enzima é desfosforilada, fica abolida a inibição por ATP/ADP e sua atividade é grandemente estimulada, elevando-se a produção de ATP, assim como o potencial de membrana e a produção de espécies reativas de oxigênio (Cap. 37).

Baseando-se na observação de que no diabetes tipo 2 a produção de ATP está diminuída quando a subunidade β de ATP sintase é fosforilada, foi proposto que este complexo seja também regulado por fosforilação/desfosforilação. Note que a secreção de insulina nas células β do pâncreas é dependente de ATP porque o ATP se liga ao canal de potássio sensível ao ATP (leia sobre secreção de insulina no capítulo 21 e no quadro da pág. 94).

Regulação por hormônios tireoideanos

Os hormônios tireoidianos atuam em dois níveis na mitocôndria. Em ratos, o T_3 estimula a síntese de UCP-2 e de UCP-3, que podem desacoplar o gradiente de prótons, mas isto não foi documentado em humanos. Adicionalmente, T_2 se liga ao complexo IV no lado da matriz, induzindo engano na citocromo oxidase *c*. O termo 'engano' significa que o complexo IV bombeia menos prótons por elétron transportado através do complexo, resultando em termogênese. As ações de T_3 e T_2 podem explicar, em parte, a longo prazo e curto prazo, respectivamente, os efeitos termogênicos dos hormônios tireoidianos (Cap. 39).

Resumo

O sistema de transporte de elétrons consiste de carreadores de elétrons que estão localizados na membrana mitocondrial interna, cada um dos quais sendo isolado como complexo ou como molécula única. Os elétrons das quatro principais flavoproteínas alimentam com elétrons a ubiquinona, o primeiro membro da via comum. A energia derivada da condução de elétrons através do sistema de transporte de elétrons é utilizada por três dos complexos para bombear prótons para espaço intermembrana, estabelecendo o gradiente eletroquímico ou força próton-motriz. O gradiente de prótons é utilizado para capacitar a ATP sintase na síntese de ATP pela catálise giratória assim como o transporte de intermediários através da membrana interna. Numerosas toxinas podem prejudicar gravemente o sistema de transporte de elétrons, a ATP sintase e a translocase que troca ATP e ADP através da membrana mitocondrial interna. A velocidade de produção de ATP pelo sistema de transporte de elétrons é regulada pela modulação do gradiente de prótons, por modificações alostéricas, por fosforilação-desfosforilação e por hormônios tireoidianos. Pelo menos cinco UCPs com distribuições em tecidos específicos localizam-se na membrana mitocondrial interna e estas regulam os potenciais de membrana e a termogênese. Doenças ou condições crônicas como o diabetes, o câncer, a obesidade e o envelhecimento estão todas ligadas à desregulação da fosforilação oxidativa através do efeito sobre o sistema de transporte de elétrons e sobre a ATP sintase.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

Teste seus conhecimentos

1. Tanto as lançadeiras de glicerol-3-fosfato quanto as de malatoaspartato transportam elétrons para o interior da mitocôndria a partir do NADH citoplasmático. Explique por que a lançadeira de glicerol-3-fosfato é mais termogênica do que a lançadeira de malato-aspartato. Por que há dois sistemas de transporte separados?

2. Descreva por que a síntese aumentada de UCP pode diminuir a síntese de ATP.

3. Quantas rotações de 360° da ATP sintase ocorrem como resultado de uma volta do ciclo do TCA se todos os componentes estiverem totalmente acoplados?

4. Que tipos de inibidores podem mimetizar os defeitos genéticos da citocromo oxidase?

5. Descreva como a defi ciência de ribofl avina pode impedir gravemente a síntese de ATP

Leituras sugeridas

Argyropoulos G, Harper ME. Uncoupling proteins and thermoregulation. *J Appl Physiol*. 2002;92:2187-2198.

Crompton M. Mitochondria and aging: a role for the permeability transition? *Aging Cell*. 2004;3:3-6.

Dimauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory chain diseases. *N Engl J Med*. 2003;348:2656-2668.

Fearnley IM, et al. Proteomic analysis of the subunit composition of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from bovine heart mitochondria. *Methods Mol Biol*. 2007;357:103-125.

Gambert S, Ricquier D. Mitochondrial thermogenesis and obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10:664-670.

Harper ME, Seifert EL. Thyroid hormone effects on mitochondrial energetics. *Thyroid*. 2008;18:145-156.

Kadenbach B. Instrinsic and extrinsic uncoupling of phosphorylation. *Biochim Biophys Acta –Bioenergetics*. 2003;1604:77-94.

Soane L, et al. Mechanisms of impaired mitochondrial energy metabolism in acute and chronic neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res*. 2007;85:3407-3415.

Sites

Filmes sobre a ATP sintase. www.cnr.berkeley.edu/~hongwang/Project/ATP_syntase/ATPsynthase.

- http://vcell.ndsu.nodak.edu/animations/atpgradient/index.htm

Google Google: 'ATP synthase movies'

Fosforilação oxidativa Fosforilação oxidativa. www.sp.uconn.edu/~terry/images/anim/ETS.html.

http://bcs.whfreeman.com http://bcs.whfreeman.com/thelifewire/content/chp07/0702001.html

Bioenergética Bioenergética. www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/oxphos/.

Centro de doenças neuromusculares Centro de doenças neuromusculares. www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mitosyn.html.

The Children's Mitochondrial Disease Network. www.emdn-mitonet.co.uk/.

Doenças mitocondriais Doenças mitocondriais:

- www.umdf.org/mitodisease/
- www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mitosyn.html

Função do Trato Gastrointestinal

U.V. Kulkarni, I. Broom

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os principais estágios da digestão.
- Discutir os mecanismos envolvidos na absorção de nutrientes no trato gastrointestinal.
- Discutir o papel das enzimas digestivas.
- Discutir a digestão das principais classes de nutrientes: carboidratos, proteínas e gorduras.
- Identificar compostos gerados pela digestão de carboidratos, proteínas e gorduras que se tornam substratos para metabolismo posterior.

INTRODUÇÃO

O alimento fornece ao organismo fontes de energia e materiais para formar ou renovar estruturas do corpo. A sobrevivência do organismo é dependente de sua habilidade de extrair esses recursos a partir da ingestão de alimentos.

O alimento ingerido entra pelo trato gastrointestinal (TGI). O T GI e os órgãos funcionalmente associados a ele, principalmente o fígado e o pâncreas, são responsáveis pelo processo de digestão e absorção. A digestão é o processo pelo qual as moléculas de nutrientes são transformadas em componentes simples que são suficientes para serem absorvidos pelo intestino. A absorção é o processo de captação desses produtos da digestão pelas células intestinais (enterócitos) e distribuição para todo o corpo. A digestão e a absorção dos nutrientes estão estreitamente relacionadas. A digestão é regulada pelo sistema nervoso, por vários hormônios e por fatores parácrinos. A presença física de partículas de alimento no TGI também estimula o processo digestivo.

As principais classes de macromoléculas contidas nos alimentossão carboidratos, proteínas e lipídios

Os carboidratos e lipídios servem principalmente como fontes de energia (combustíveis metabólicos; consulte a Tabela 9.1 para obter valores energéticos), mas também têm funções não energéticas no organismo. As proteínas, por outro lado, são usadas principalmente para fins não energéticos, mas podem, sob certas circunstâncias, servir como fonte de energia. As proteínas, os carboidratos e as gorduras existem em diferentes proporções nos alimentos. Além disso, alguns materiais ingeridos, como alguns carboidratos complexos de origem vegetal, não são digeríveis e constituem o que é chamado de “fibra”.

O TRATO GASTROINTESTINAL

O TGI é efetivamente um longo tubo enrolado em que o fígado e o pâncreas drenam para dentro dele através de ductos secretórios. Sua função é transferir os componentes do alimento de fora para dentro do organismo (Fig. 10.1). Para aperfeiçoar essa função, suas diferentes partes anatômicas possuem funções específicas relacionadas à digestão e à absorção:

- o estômago e o duodeno encarregam-se dos processos iniciais de misturar e digerir os alimentos ingeridos
- o jejuno continua com os processos digestivos e começa o processo de absorção
- o íleo absorve os nutrientes digeridos; o cólon está envolvido na absorção de fluidos e eletrólitos

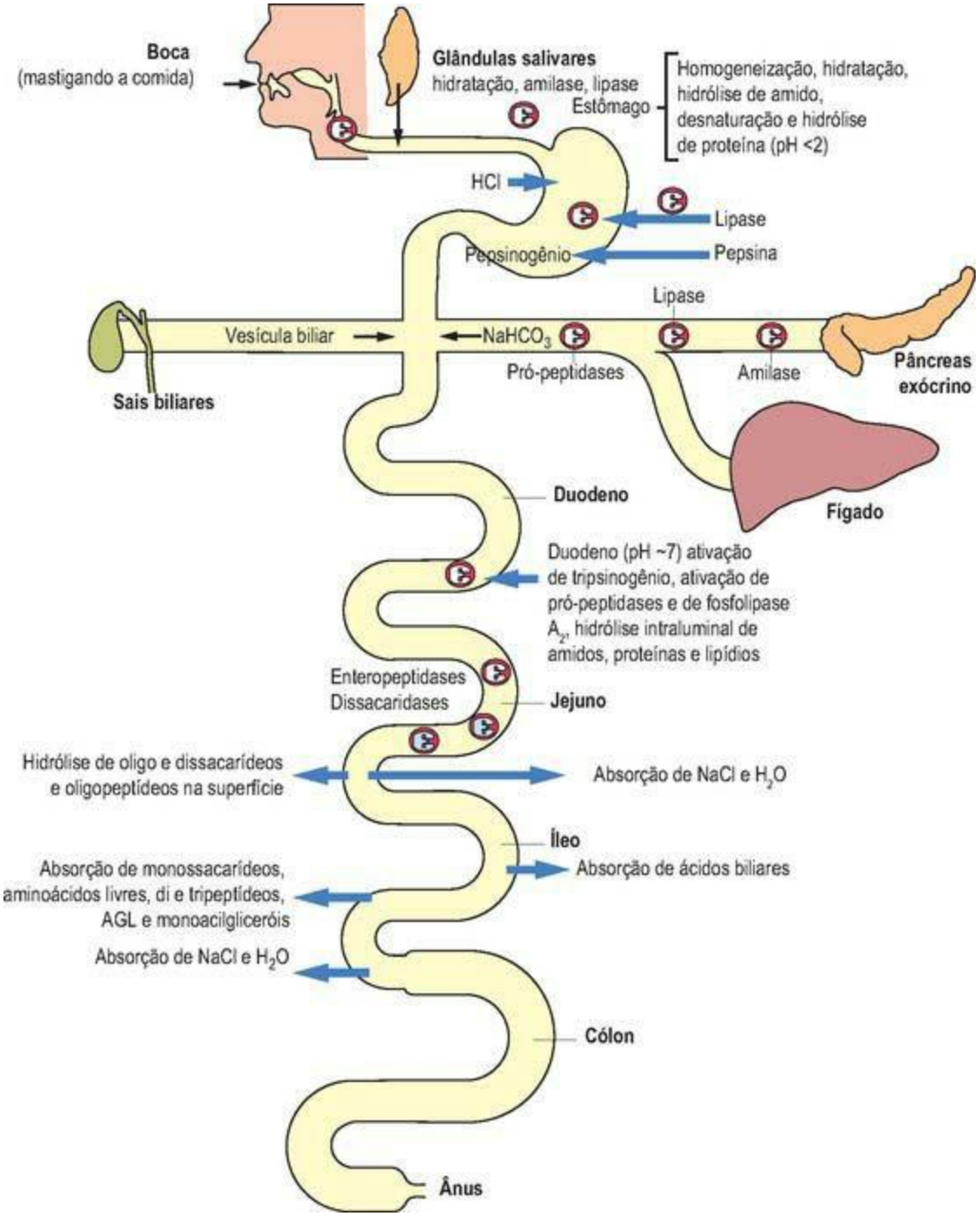


Fig. 10.1 O trato gastrointestinal (TGI). A digestão e a absorção de nutrientes requerem a função integrada de vários órgãos. A mistura de alimentos e o início da digestão ocorrem no estômago. A digestão continua no jejuno, onde o processo de absorção começa. A maior parte dos nutrientes é absorvida no íleo. O intestino grosso está envolvido na absorção de água e eletrólitos, e participa da recirculação de ácidos biliares para o fígado (Cap. 29). Levando em conta toda a ingestão e secreções, grande quantidade de fluido passa através do TGI (aproximadamente 7 litros) por dia. AGL, ácidos graxos livres.

Ao longo da extensão do TGI, vários fluidos, eletrólitos e proteínas são adicionados para auxiliar na mistura, hidratação e digestão dos alimentos. O intestino faz mais do que simplesmente passar todos os alimentos digeridos para os outros órgãos, como o fígado. Ele irá, por exemplo, tratar o monossacarídeo simples, a glicose, diferentemente quando este for recebido do lúmen ou da corrente sanguínea mesentérica. A glicose absorvida do lúmen é transferida diretamente para o fígado sem sofrer alteração, enquanto a glicose recebida da corrente sanguínea é metabolizada a lactato antes de chegar ao fígado. O aminoácido glutamina, derivado das proteínas da dieta, é usado pelos enterócitos como fonte principal de energia e não é liberado para a circulação da veia porta, a

qual vai para o fígado (ver a seguir).

As bases mecânicas e anatômicas da digestão

Há um componente da digestão que é puramente mecânico. A mastigação e a digestão preliminar dos alimentos ocorrem inicialmente na boca. O alimento é então engolido para o esôfago através de um processo impulsionado pelo reflexo esofágico. O alimento é quebrado em partículas menores à medida que atravessa o TGI superior, como no estômago, e somente a sua presença provoca peristaltismo, o que ajuda a misturar e a estimular as secreções digestivas. Os principais estímulos para a peristalse são mediados através do sistema nervoso parassimpático. O estômago e os intestinos têm superfícies invaginadas, as quais aumentam suas áreas de superfície. O intestino delgado, que contém a principal superfície de absorção, tem pregas mucosas, enterócitos arranjados em vilosidades e microvilosidades intestinais.

Volume e pH das secreções intestinais

A manutenção da concentração apropriada do íon hidrogênio em diferentes partes do TGI é crucial para o processo digestivo e também para a preservação dos tecidos subjacentes gástricos e intestinais. A saliva secretada na boca é alcalina devido ao seu conteúdo de bicarbonato. A constituição do lúmen do estômago é extremamente ácido, enquanto o muco que reveste suas paredes é alcalino. O conteúdo ácido do estômago é neutralizado pelas secreções pancreáticas alcalinas quando elas entram no duodeno.

As secreções intestinais alcançam um volume de 7,5 L por dia, além de uma ingestão média de água de aproximadamente 1,5 L. A maior parte desse fluido é absorvida de volta pelo TGI inferior e, em circunstâncias normais, apenas 150-250 mL da água estão contidos nas fezes.

A perda excessiva defluidos do trato gastrointestinal pode causar distúrbios de fluido, eletrólitos e do equilíbrio acidobase

O vômito prolongado, isto é, a perda do conteúdo primário do estômago pela boca, causa a perda direta de água, hidrogênio e íons cloreto, e posteriormente a perda de potássio devido a mecanismos de compensação do corpo. A diarreia pode ser causada pelo aumento de secreção intestinal devido, por exemplo, a inflamação ou pode ser causada por má absorção de nutrientes. Diarreia severa, acarretando perda de grande quantidade do conteúdo alcalino intestinal, pode levar a desidratação e acidose metabólica. A diarreia também resulta em perda de sódio, potássio e outros minerais (Caps. 11, 23 e 24).

DIGESTÃO

A digestão é um processo sequencial e ordenado

O processo de digestão é caracterizado por várias etapas específicas, que ocorrem em uma sequência, permitindo interações entre fluidos, pH, agentes emulsificantes e enzimas. Para tais interações, é necessária a ação secretória em conjunto das glândulas salivares, fígado e vesícula biliar, do pâncreas e da mucosa intestinal. Os processos envolvidos estão esboçados na Figura 10.1 e podem ser resumidos como:

- lubrificação e homogeneização de alimentos com os fluidos secretados pelas glândulas do trato gastrointestinal, começando na boca;
- secreção de enzimas cuja função primária é a quebra de macromoléculas para formar uma mistura de oligômeros, dímeros e monômeros;
- secreção de eletrólitos, íons hidrogênio e bicarbonato em partes diferentes do TGI para aperfeiçoar as condições de hidrólise enzimática específica de uma região do TGI;
- secreção de ácidos biliares para emulsionar os lipídios da dieta, permitindo a hidrólise enzimática apropriada e a absorção;
- posterior hidrólise de oligômeros e dímeros dentro do jejuno por enzimas de superfície ligadas a membranas;
- transporte específico de material digerido para dentro dos enterócitos e daí para o sangue ou a linfa.

Várias secreções do TGI e seus órgãos acessórios estão envolvidas nesse processo e cada área contém glândulas especializadas e propriedades únicas da superfície epitelial (Tabela 10.1).

Tabela 10.1 Organização funcional do trato gastrointestinal.

Organização funcional do trato gastrointestinal	
Órgão gastrointestinal	**Função primária na absorção de alimentos**
Glândulas salivares	Produção de fluidos e enzimas digestivas para homogeneização, lubrificação e digestão de carboidratos (amilase) e lipídios (lipase lingual)
Estômago	Secreção de HCI e proteases para iniciar a hidrólise de proteinas
Pâncreas	Secreção de bicarbonato, proteases e lípases para continuar a digestão de proteínas e lipídios, e amilase para continuar a digestão de amidos
Fígado e vesícula biliar	Secreção e armazenamento de ácidos biliares para liberar no intestino delgado
Intestino delgado	Digestão intraluminal final de alimentos, digestão de dímeros de carboidratos e vias específicas para absorção de material digerido
Intestino grosso	Absorção de fluidos, eletrólitos e produtos da ação de bactérias do cólon

Em geral, existe uma reserva funcional considerável em todos os aspectos da digestão e da absorção. Uma pequena perda funcional pode passar sem a percepção do indivíduo, permitindo que a patologia progrida por algum tempo antes de ser diagnosticada. Sinais e sintomas de má digestão ou má absorção gastrointestinal requerem, consequentemente, prejuízo considerável da relação estrutura/função para se manifestar. Cada um dos órgãos envolvidos na digestão e na absorção tem a capacidade de aumentar a sua atividade várias vezes em resposta a estímulos específicos; isso aumenta enormemente a capacidade de reserva funcional do intestino. Por exemplo, para uma doença do pâncreas se manifestar, 90% da função pancreática precisa ser destruída. Além disso, o TGI pode prover a perda da função de um órgão em particular. Por exemplo, o estômago pode ser removido cirurgicamente por causa de um câncer, pois tanto o pâncreas quanto o intestino delgado podem compensar a perda total da digestão gástrica. Em uma doença pancreática, as lipases linguais podem prover, em parte, alguma perda da produção de lipase pancreática.

Enzimas digestivas e zimogênios

A maioria das enzimas digestivas no TGI é secretada como precursores inativos

Com a exceção das amilases salivar e lingual (associada com a língua; por essa razão, oral), as enzimas digestivas são secretadas no lúmen intestinal como precursores inativos chamados zimogênios (Cap. 6). A secreção de enzimas intestinais é semelhante nas glândulas salivares, na mucosa gástrica e no pâncreas. Esses órgãos contêm células especializadas para síntese, armazenamento e transporte de enzimas para a superfície celular, e daí ao lúmen intestinal. Essas secreções são denominadas exócrinas, isto é, "secretam para fora", ao contrário da secreção endócrina de hormônios.

As enzimas envolvidas na digestão de proteínas (proteases) e a fosfolipase A_2 são sintetizadas como zimogênios inativos e somente são ativadas quando liberadas no lúmen intestinal. Em geral, essas enzimas, uma vez na sua forma ativa, podem ativar os seus próprios precursores. A ativação dos seus precursores pode acontecer por mudança de pH (p. ex., pepsinogênio no estômago é convertido em pH abaixo de 4,0 à enzima ativa, a pepsina) ou pela ação de enteropeptidases específicas ligadas à membrana da mucosa do duodeno (Fig. 10.1).

Todas as enzimas digestivas são hidrolases

Todas as enzimas digestivas hidrolisam seus substratos. Os produtos de tais processos hidrolíticos são oligômeros, dímeros e monômeros da macromolécula precursora. Assim, os carboidratos são hidrolisados a uma mistura de dissacarídeos e monossacarídeos. As proteínas são quebradas em uma mistura de di e tripeptídeos e aminoácidos. Os lipídios, porém, são tratados de forma diferente – são desdobrados em uma mistura de ácidos graxos (AG), glicerol e mono e diacilgliceróis (Fig. 10.2).

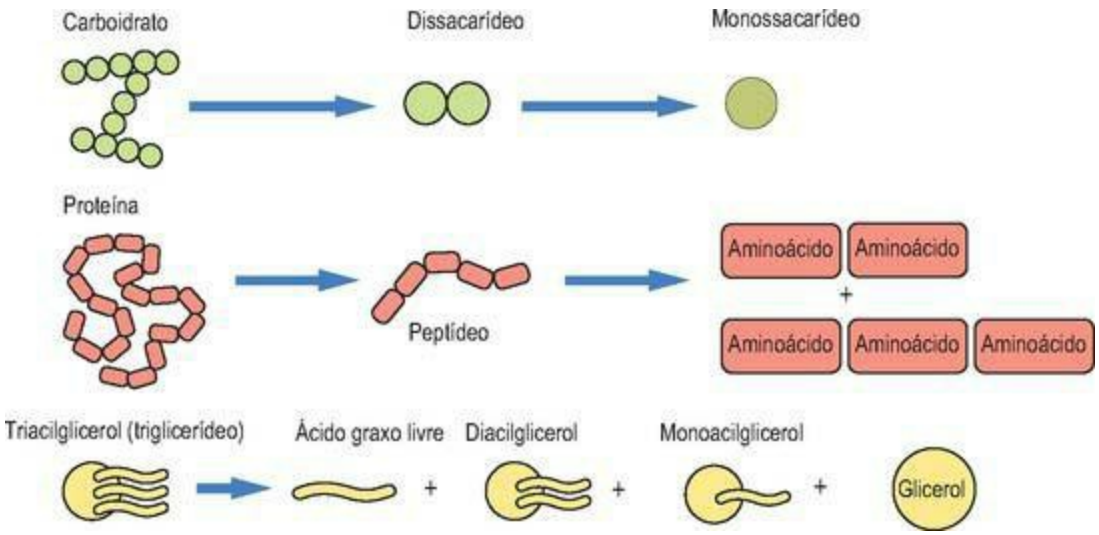


Fig. 10.2 Digestão de polímeros da dieta. Polissacarídeos são digeridos em di e monossacarídeos, e proteínas, em aminoácidos. A gordura ingerida é, na maioria das vezes, na forma de triacilgliceróis (triglicerídeos), ésteres de glicerol e ácidos graxos. Durante a digestão ocorre uma remoção gradativa de moléculas de ácidos graxos, produzindo di e monoacilgliceróis.

DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE CARBOIDRATOS

Os carboidratos da dieta entram no TGI como mono, di epolissacarídeos

Os carboidratos da dieta consistem, principalmente, em amidos de origem animal e vegetal (polissacarídeos), os dissacarídeos sacarose e lactose, e os monossacarídeos (Fig. 10.3). Os monossacarídeos incluem glicose, frutose e galactose, os quais tanto estão presentes na dieta como são produzidos pela digestão de di e polissacarídeos, por exemplo: a galactose é derivada principalmente de produtos lácteos. Esses monômeros de açúcar não precisam ser digeridos para ser absorvidos pelo TGI.

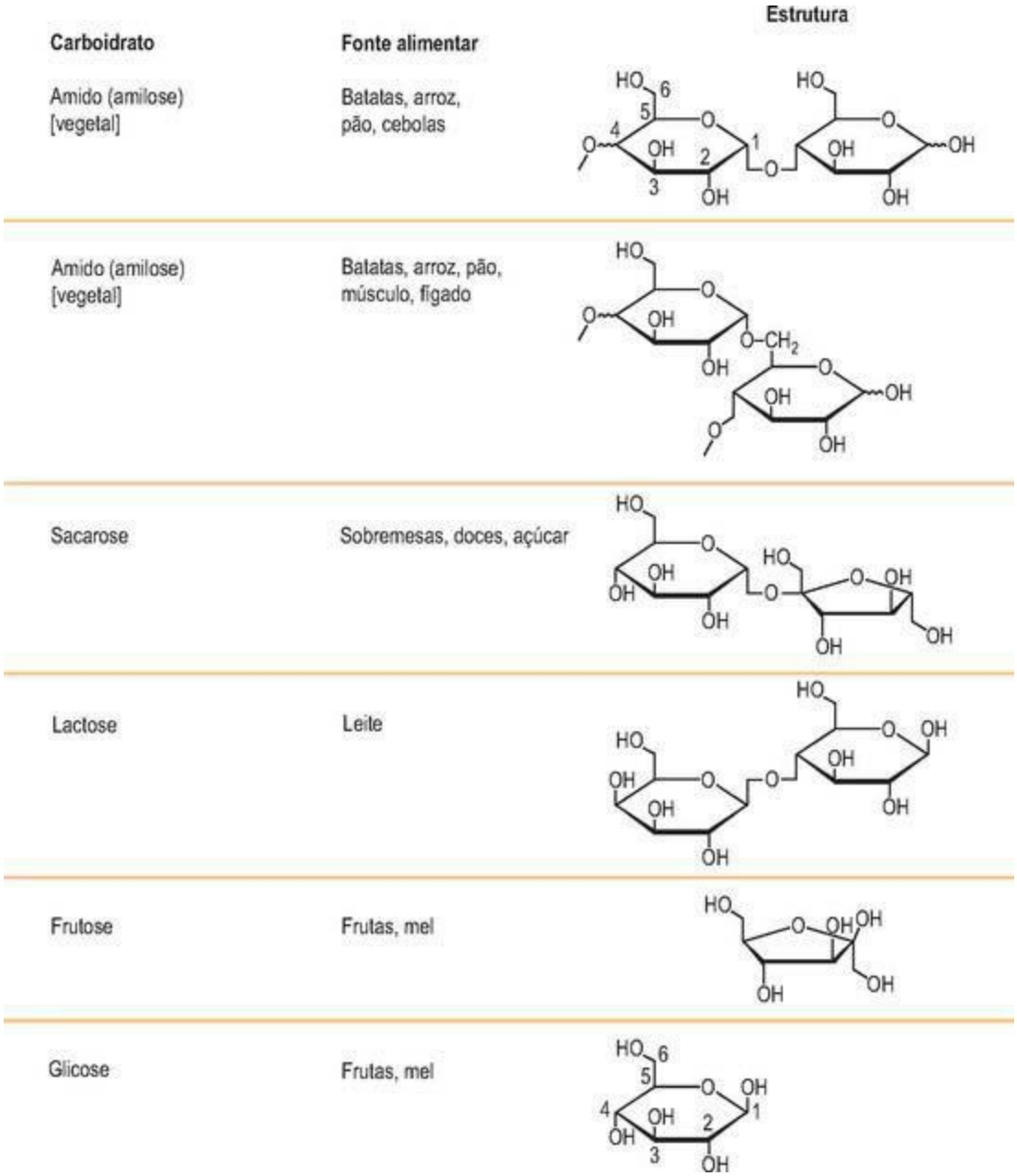


Fig. 10.3 Estrutura dos principais carboidratos da dieta. Amido e amilopectina são polissacarídeos, e apenas duas moléculas de açúcar são mostradas para cada uma para ilustrar as ligações intermoleculares. Sacarose e lactose são os dissacarídeos mais comuns, e frutose e glicose são os monossacarídeos mais comuns. Os monossacarídeos não requerem digestão posterior. Referir a molécula de glicose para padronizar o número de átomos de carbono (Cap. 3).

Os monossacarídeos existem sob várias formas isoméricas. A sua classificação em formas D- e L-é baseada na orientação dos grupamentos de hidrogênio e hidroxila com relação ao átomo de carbono assimétrico adjacente ao grupamento álcool terminal. Esses isômeros rotacionam a luz polarizada para a direita (D) e para a esquerda (L). A molécula de referência para esse sistema de classificação é o monossacarídeo mais simples (triose), o gliceraldeído. Nas formas cíclicas (anel) de pentose e açúcares mais complexos, o átomo de carbono na posição 1 também se torna assimétrico (anomérico). Diferentes arranjos espaciais nessa posição resultam em α- ou β-anômeros. Os α-anômeros têm o grupamento hidroxila apontado para baixo do plano da estrutura do ciclo, enquanto os β-anômeros têm o grupo hidroxila apontado para cima do plano (Cap. 3).

Dissacarídeos e polissacarídeos, como amido e glicogênio, requerem clivagem hidrolítica em monossacarídeos antes da absorção

Os dissacarídeos são quebrados por dissacaridases de membrana presentes na superfície da mucosa intestinal. O amido e o glicogênio requerem hidrólise adicional pela enzima amilase encontrada nas secreções das glândulas salivares e do pâncreas (Fig. 10.4).

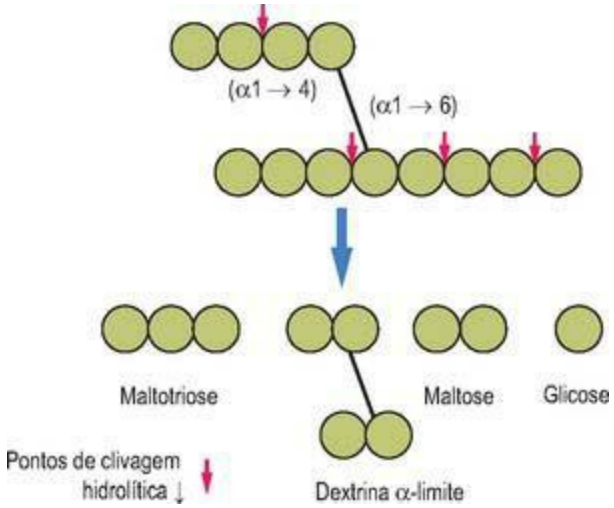


Fig. 10.4 Clivagem hidrolítica de polissacarídeos. Hidrólise enzimática é o mecanismo de digestão de polissacarídeos e dissacarídeos. As setas ilustram os pontos de clivagem e o tipo de ligação hidrolisada. Note que a dextrina α-limite ainda contém as ligações α1-4 e α1-6.

O amido é um polissacarídeo vegetal e o glicogênio é o seu equivalente animal. Ambos contêm uma mistura de cadeias lineares de moléculas de glicose ligadas por ligações glicosídicas α-1,4 (amilose) e por cadeias ramificadas de glicose com ligações α-1,6 (amilopectina). O glicogênio contém mais ramificações do que o amido. A digestão desses polissacarídeos é promovida por endossacaridases e amilases produzidas pelas glândulas salivares e pelo pâncreas. A amilase no lúmen intestinal não está ligada aos enterócitos que formam a membrana da mucosa.

Os produtos da hidrólise do amido são o dissacarídeo maltose, o trissacarídeo maltotriose e uma unidade ramificada, chamada dextrina α-limite. Esses produtos são hidrolisados novamente por enzimas ligadas à membrana mucosa dos enterócitos para formar o monossacarídeo glicose (Fig. 10.5A).

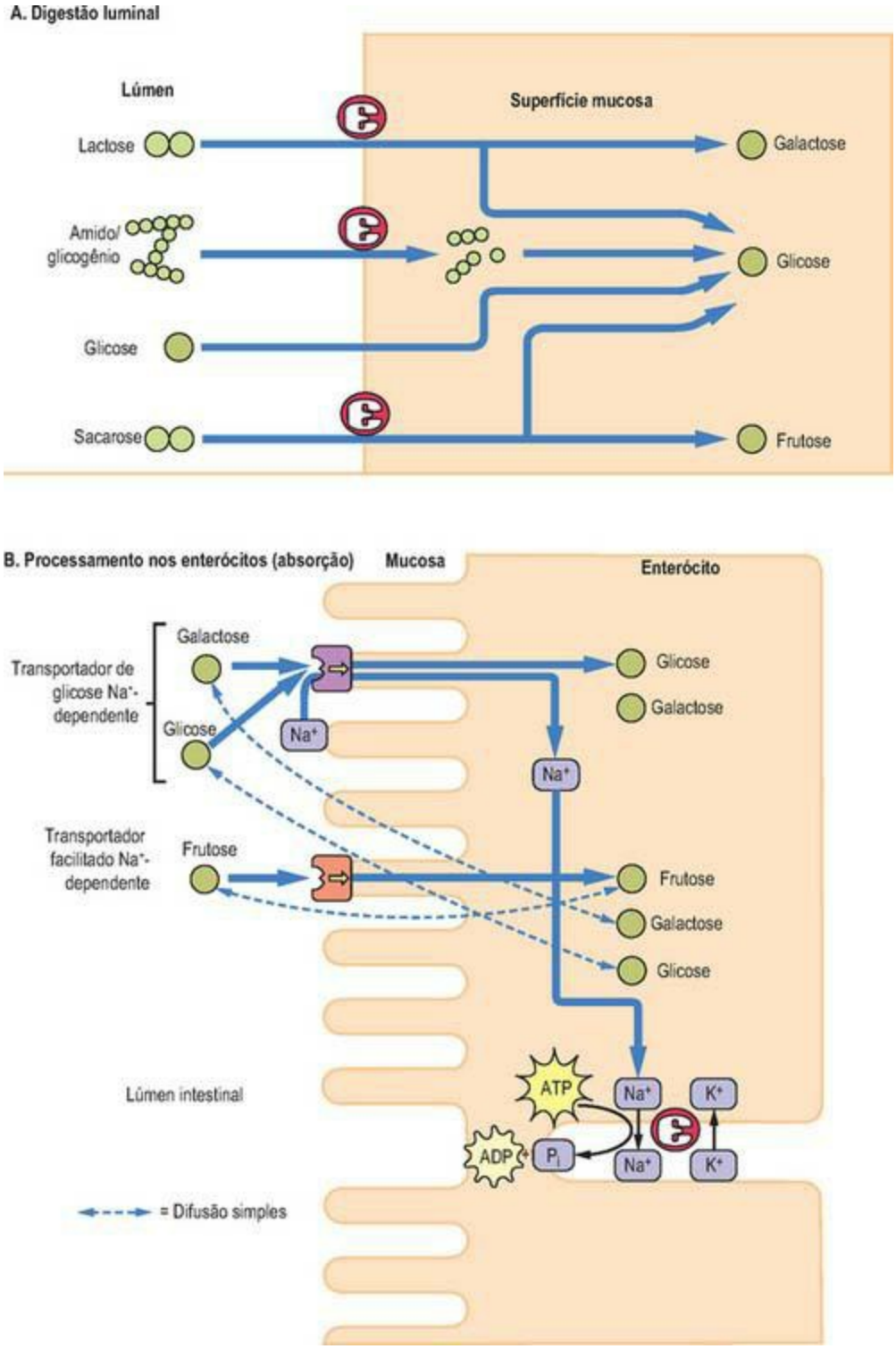


Fig. 10.5 Digestão e absorção de carboidratos da dieta. (A) Os monossacarídeos são geralmente resultado da hidrólise de diferentes polissacarídeos. Note que a digestão preliminar ocorre no lúmen intestinal e a etapa final ocorre na superfície da membrana mucosa. (B) A ligação entre absorção de monossacarídeos e sódio e sua relação com a atividade Na-K-ATPase (Cap. 8). ADP, difosfato de adenosina; ATP, trifosfato de adenosina; Pi, fosfato inorgânico. Compare com a Figura 8.5.

Os dissacarídeos da dieta como lactose, sacarose e trealose (um dissacarídeo composto de duas moléculas de glicose na ligação 1,1) são hidrolisados em seus constituintes açúcares monoméricos por uma série de dissacaridases específicas, que estão ligadas nas membranas da borda em escova do intestino delgado. Os domínios catalíticos dessas enzimas estão voltados para o lúmen do intestino para reagir com seus substratos específicos, enquanto os domínios estruturais não catalíticos estão ligados à membrana do enterócito.

Com exceção da lactase, todas as dissacaridases são induzíveis

Quanto maior a quantidade de um dissacarídeo (p. ex., sacarose) encontrada na dieta ou produzida pela digestão, maior será a quantidade de dissacaridase específica produzida pelo enterócito (p. ex., sacarase). A etapa limitante na taxa de absorção de dissacarídeos da dieta é o transporte dos monossacarídeos resultantes. A lactase é uma dissacaridase não indutiva da borda em escova, então o fator limitante da taxa de absorção da lactose é a sua hidrólise e não o transporte de glicose e galactose.

Existem sistemas de transporte passivos e ativos que transportam monômeros de carboidratos através da membrana da borda em escova

O processo da digestão resulta em grande aumento no número de partículas de monossacarídeos osmoticamente ativas para dentro do lúmen intestinal. A água será, portanto, retirada da mucosa TGI e do compartimento vascular para o lúmen. O aumento da hidrólise na borda em escova, assim, aumentará a carga osmótica, enquanto o transporte aumentado de monossacarídeos através da borda em escova irá diminuí-la. Como discutido anteriormente, para a maioria das oligo e dissacaridases, o transporte dos monômeros produzidos é um fator limitante. Por essa razão, existem mecanismos compensatórios para evitar o acúmulo de fluidos no intestino. À medida que as concentrações de açúcares monoméricos aumentam no lúmen intestinal, a osmolalidade aumenta, e há uma diminuição compensatória na atividade das dissacaridases da borda em escova. Esse procedimento controla a carga osmótica e previne o movimento dos fluidos.

A glicose, a frutose e a galactose são os principais monossacarídeos produzidos pela digestão dos carboidratos da dieta. A absorção desses açúcares e de outros monossacarídeos menos importantes ocorre via mecanismos específicos mediados por transportadores (Fig. 10.5B), todos os quais demonstram especificidade para o substrato e estereoespecificidade, mostrando cinética de saturação, e podem ser especificamente inibidos. Além disso, todos os monossacarídeos podem passar pela membrana da borda em escova através de um processo de difusão simples, embora seja extremamente lento.

DIGESTÃO DE POLISSACARÍDEOS

Durante a alimentação, a homogeneização ocorre com a mastigação na boca, a ação das paredes musculares do estômago e das dobras gástricas. Uma consequência disso é que os polissacarídeos da dieta se tornam hidratados. A hidratação dos polissacarídeos é essencial para a ação da amilase. Essa enzima é específica para as ligações α 1,4-glicosídicas internas e é completamente inerte para as ligações α 1,6. Além disso, a amilase não atua nas ligações α 1,4 de resíduos de glicosil que participam das ramificações. As unidades clivadas assim formadas pela sua ação são o dissacarídeo maltose, o trissacarídeo maltotriose e um oligossacarídeo com uma ou mais ramificações α 1,6 e que contêm, em média, oito unidades glicosil, chamadas de "dextrinas α-limites". Esses compostos são, então, posteriormente clivados em unidades de glicose pela oligossacaridase e α-glicosidase, sendo esta última a responsável por remover os resíduos de glicose de ligações α 1,4 da extremidade não redutora dos oligossacarídeos (incluindo maltose). O complexo sacarase-isomaltase é secretado como uma única molécula polipeptídica precursora e é ativado em duas enzimas, uma das quais (isomaltase) é responsável pela clivagem hidrolítica das ligações α,1,6 glicosídicas. O produto final da digestão dos amidos é, portanto, a glicose, que é gerada através de uma série complexa de reações enzimáticas. A digestão inicial, que ocorre livre no lúmen, envolve a amilase, enquanto os processos

finais envolvem α -glicosidases e isomaltase, as quais estão ligadas à membrana mucosa dos enterócitos.

Existem pelo menos dois sistemas de transporte mediados por transportadores para os monossacarídeos — um cotransportador sódio -dependente e um transportador sódio-independente

Na membrana de borda em escova, tanto a glicose quanto a galactose são transportadas pelo transportador de glicose sódio-dependente. Essa proteína ligada à membrana liga-se à glicose ou galactose e ao Na +, em sítios separados, e ambos são transportados para o citosol dos enterócitos. O Na + é, desse modo, transportado a favor do seu gradiente de concentração (a concentração no lúmen intestinal é maior do que no interior da célula), levando junto a glicose contra o seu gradiente de concentração. Esse mecanismo de transporte é ligado à Na/K-ATPase, o qual remove o Na + da célula em troca de K +, com hidrólise concomitante de ATP (Cap. 8). O transporte de glicose ou galactose é, assim, um processo ativo indireto. A consequência interessante desse mecanismo é que a absorção de sódio no intestino é facilitada quando alguns carboidratos estão presentes no lúmen.

A frutose é transportada através da membrana de borda em escova por um processo de difusão facilitada sódio-independente envolvendo proteínas específicas associadas à membrana, o transportador de glicose GLUT-5, que está presente no lado da orda em escova do enterócito, e o GLUT 2, uma proteína que transporta monossacarídeos do interior do enterócito para dentro da circulação (Tabela 8.2).

O ESTÔMAGO

Existem diferentes tipos celulares na parede da mucosa do estômago, as quais apresentam diferentes funções digestivas. As células chamadas “células-chefe” secretam pepsinogênio, o qual é um precursor da pepsina, uma peptidase. O pepsinogênio é ativado em pepsina no ambiente ácido do lúmen do estômago. A acidez é mantida pela secreção de íon hidrogênio. Isso é feito pelas células parietais que geram íons hidrogênio no estômago pela ação da anidrase carbônica e, assim, secreta o hidrogênio no lúmen pela bomba de prótons ATP-dependente localizada na membrana luminal dessas células. A atividade das células parietais é estimulada pela ação da histamina, que é produzida pelas células secretoras de histamina, atuando nos receptores H 2. O hormônio gastrina é secretado por células G no estômago, estimulado pela entrada de alimento no estômago. As células do estômago também secretam o fator intrínseco (Fl), o qual facilita a absorção de vitamina B 12 no intestino (Cap. 11). Por fim, porém não menos importante, as células do estômago secretam muco alcalino, o qual protege a sua parede contra os efeitos do ácido forte. Úlceras podem resultar de um dano à parede do estômago ou do duodeno. O tratamento de úlceras é fundamentado na neutralização do ácido pela ingestão de suspensões alcalinas, pelo bloqueio de receptores H 2 (Fig. 8.6) que, assim, são o maior estímulo para secreção ácida ou pela inibição da bomba de próton.

DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE LIPÍDIOS

Glóbulos de gordura da dieta precisam ser emulsificados antes que sua digestão possa ocorrer

Aproximadamente 90% das gorduras da dieta são triacilgliceróis (TAG), também chamados de triglicerídios. Os demais consistem em colesterol, ésteres de colesterol, fosfolipídios e ácidos graxos não esterificados (AGNE). A natureza hidrofóbica das gorduras exclui as enzimas digestivas hidrossolúveis. Além disso, os glóbulos de gordura apresentam uma área de superfície limitada para a ação das enzimas. Essas questões são superadas pelo processo de emulsificação.

A mudança na estrutura física dos lipídios começa no estômago: a temperatura dentro dele ajuda a liquefazer os lipídios da dieta, e os movimentos peristálticos ajudam na formação de uma emulsão lipídica. As lipases gástricas e salivares, estáveis no meio ácido, também ajudam no processo de emulsificação. A taxa inicial de hidrólise é lenta devido à separação da fase lipídica da aquosa e da interface relativamente pequena dos lipídios com a água. Uma vez iniciada a hidrólise, contudo, os TAG imiscíveis em água são degradados a ácidos graxos, os quais agem como surfactantes. Eles conferem uma superfície hidrofílica às gotículas de lipídios e as quebram em partículas menores, aumentando sua superfície e permitindo uma hidrólise mais rápida. A fase lipídica, portanto, torna-se dispersa por toda a fase aquosa como uma emulsão.

Outros fatores da dieta também agem como surfactantes. Eles incluem os fosfolipídios, os ácidos graxos e os monoacilgliceróis, os quais ajudam no processo de emulsificação e favorecem a ligação de lipases ácido-estáveis à interface lipídio-água. Assim, facilitam a hidrólise dos TAG e a emulsificação das gotículas de lipídios.

O PNCREAS

O pâncreas encontra-se na região retroperitoneal, posterior ao estômago, e contém duas partes funcionalmente distintas: a parte exócrina, a qual secreta enzimas digestivas, e a parte endócrina, as ilhotas de Langerhans, a quais secretam insulina, glucagon e outros hormônios, como a somatostatina (Cap. 21).

A parte exócrina é composta de grupos de células chamadas ácinos. As secreções exócrinas pancreáticas são liberadas no ducto pancreático, o qual se une ao duodeno junto com o ducto biliar que é comum ao fígado e à vesícula biliar. As partículas de alimentos que entram no duodeno estimulam a secreção de colecistocinina que, por sua vez, ativa a produção e a secreção de enzimas pancreáticas. A entrada do conteúdo ácido do estômago no duodeno estimula a liberação de outro hormônio, a secretina, que, por sua vez, estimula a produção do suco pancreático rico em bicarbonato, o qual neutraliza a acidez proveniente do estômago, no duodeno.

O pâncreas secreta enzimas que digerem carboidratos, lipídios e proteínas. A amilase pancreática digere os carboidratos a oligossacarídeos e monossacarídeos; a lipase digere os triacilgliceróis, enquanto a colesteril esterase gera colesterol livre e ácidos graxos; finalmente, proteases e peptidases quebram proteínas e peptídeos. Para prevenir que as proteases digiram o próprio pâncreas (autodigestão), elas são secretadas como pró-enzimas (Cap. 6) e ativadas no lúmen intestinal.

PANCREATITE

A inflamação do pâncreas é uma doença que ameaça a vida potencialmente. A pancreatite aguda pode ser causada por cálculos biliares que bloqueiam a passagem do ducto para o duodeno, pela ingestão excessiva de álcool, por algumas drogas ou viroses ou pode ser associada com altas concentrações de triacilgliceróis no plasma. Os pacientes apresentam dor abdominal grave, náusea e vômito. O marcador bioquímico mais importante para pancreatite é o aumento da atividade da enzima amilase no soro, mas o aumento da atividade da lipase sérica e o decréscimo de cálcio no soro também podem ocorrer. Em alguns pacientes, os níveis de amilase permanecem normais e portanto, outros testes como ultrassom ou tomografia computadorizada (TC) podem ser essenciais para o diagnóstico junto com os testes bioquímicos. A inflamação a longo prazo, que dura de meses a anos, é chamada de pancreatite crônica e leva a complicações metabólicas como hiperglicemia, desnutrição e, caracteristicamente, a um aumento da excreção de gordura nas fezes (esteatorreia).

No duodeno, as enzimas pancreáticas e os sais biliares agem na emulsão lipídica

A emulsão lipídica é ejetada do estômago para o duodeno, onde os lipídios da dieta sofrem o principal processo de sua digestão por enzimas secretadas pelo pâncreas. A liberação de sais biliares pela vesícula biliar ajuda na solubilização. A secreção biliar proveniente da vesícula biliar é estimulada pelo hormônio colecistocinina.

A principal enzima secretada pelo pâncreas é a lipase pancreática. Essa enzima, todavia, é inativada na presença de sais biliares normalmente secretados no intestino delgado durante a digestão dos lipídios. Essa inibição é superada pela secreção concomitante da colipase pelo pâncreas. A colipase liga-se à interface água-lipídio e à lipase pancreática, ancorando e ativando a enzima simultaneamente. Como indicado na Figura 10.6, apenas uma pequena porção de TAG da dieta é completamente hidrolisada em glicerol e ácidos graxos. O segundo e terceiro ácidos graxos dos TAG são hidrolisados com mais dificuldade; por isso, a ação da lipase pancreática produz principalmente 2-monoacilgliceróis (2-MAG) para absorção nos enterócitos.

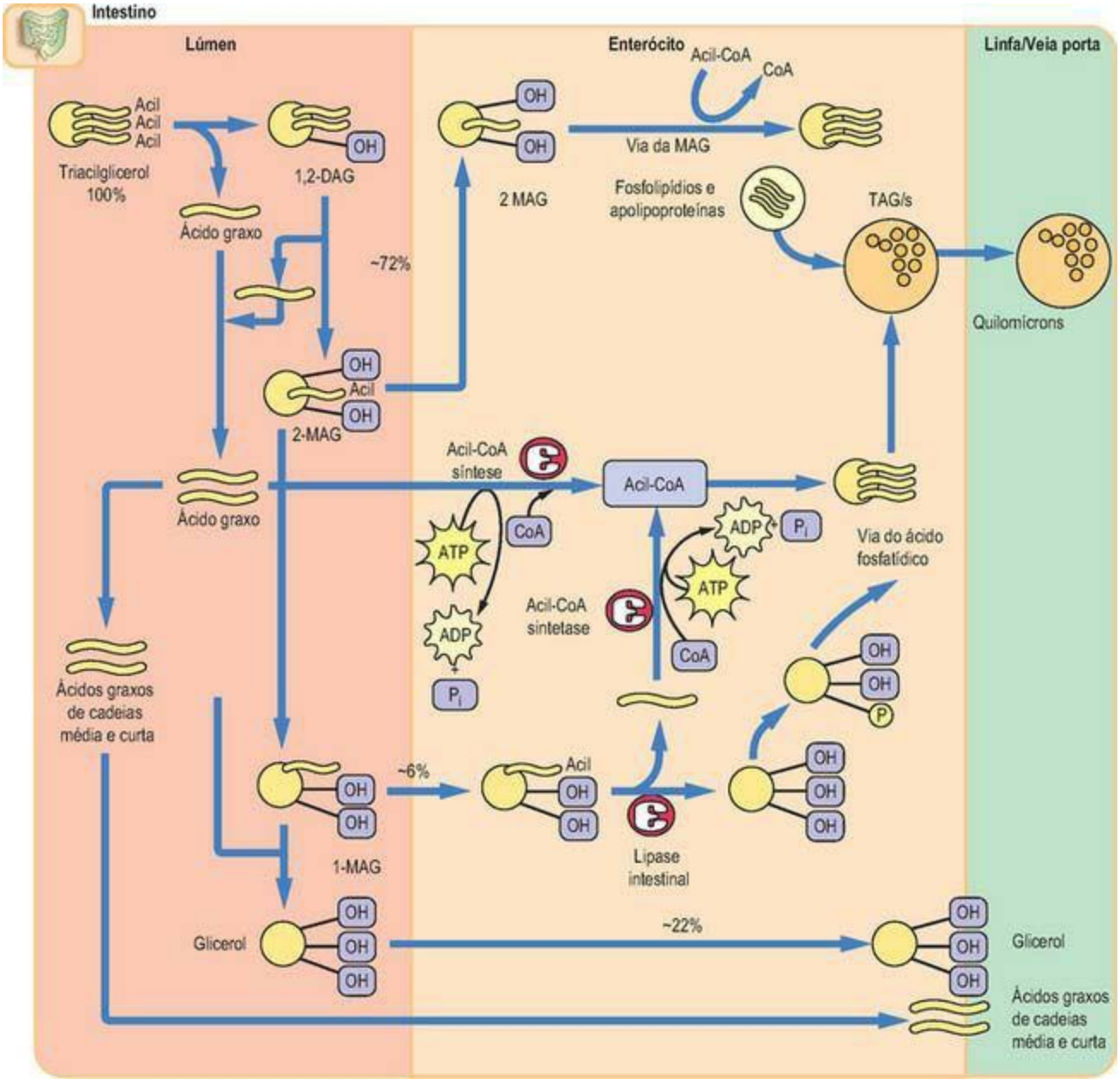


Fig. 10.6 Digestão e absorção dos lipídios da dieta. Os triglicerídeos da dieta passam por várias etapas de hidrólise no lúmen intestinal. Consequentemente, os ácidos graxos de cadeias média e longa são absorvidos dessa forma para a veia porta. Entretanto, ácidos graxos de cadeias longas (C >12) são ressintetizados a triacilgliceróis antes de serem incorporados aos quilomícrons para serem transportados para fora do intestino. Os ácidos graxos precisam ser ativados pela acetil-CoA para que ocorra a síntese de acilgliceróis. Este diagrama não leva em consideração os fatores de solubilização envolvidos na formação de micelas. Note que os enterócitos não possuem glicerol quinase: a formação de glicerol fosfato requer a presença de glicose. TAG, triacilglicerol; DAG, diacilglicerol; MAG, monoacilglicerol; CoA, coenzima A.

Sais biliares são essenciais para a solubilização de lipídios durante o processo digestivo

Sem os sais biliares agindo como detergentes, os lipídios digeridos não ficam em uma forma adequada para absorção pelo intestino. A estrutura dos ácidos biliares é demonstrada pela do ácido cólico (Fig. 10.7; Cap. 29). Sua estrutura é planar, com uma superfície hidrofóbica e uma hidrofílica. A região hidrofóbica do ácido biliar é formada pela superfície superior do conjunto de anéis, enquanto o grupo carboxila e todos os grupos hidroxila estão no lado oposto dando propriedades hidrofílicas. Os ácidos biliares, que são sais biliares no pH alcalino do intestino, formam agregados reversíveis em concentrações acima de um nível crítico, a chamada concentração micelar crítica. Tais agregados são chamados de "micelas" e seus constituintes de ácidos biliares estão em equilíbrio com os ácidos biliares livres (sais). As micelas são, dessa forma, estruturas de equilíbrio e de

tamanho bem definido, consideravelmente menor do que as gotas da emulsão lipídica. O tamanho das micelas é dependente da concentração dos ácidos biliares e da relação entre ácidos biliares e lipídios.

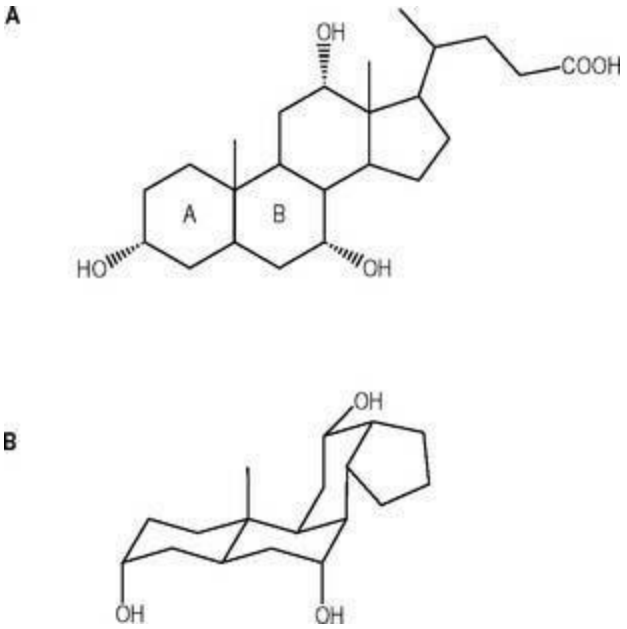


Fig. 10.7 Ácido biliar. Ácido cólico é formado no fígado. Ele é subsequentemente conjugado com os aminoácidos glicina ou taurina, formando ácido glicocólico ou taurocólico, os quais são excretados na bile (Cap. 17).

A conversão da emulsão das gorduras em estruturas micelares facilita o transporte de lipídio através do ambiente aquoso do lúmen do TGI. As micelas de sais biliares podem solubilizar outros lipídios, e essas micelas mistas têm a forma parecida com um disco. Durante a digestão dos TAG, o lipídio digerido muda de gotas de emulsão de gordura para estruturas micelares. Essas micelas medeiam o transporte dos lipídios até a borda em escova dos enterócitos, onde os lipídios são absorvidos.

A absorção de lipídios na superfície das células intestinais do intestino delgado ocorre por difusão através da membrana plasmática. A maioria dos ácidos graxos e dos 2-MAG é absorvida, pois ambos são levemente hidrossolúveis. Os lipídios não hidrossolúveis são pouco absorvidos, por exemplo, apenas 30%-40% do colesterol da dieta são absorvidos. Os sais biliares vão até o íleo, onde são absorvidos, e retornam ao fígado; esse circuito é chamado de circulação êntero-hepática (Cap. 29).

O destino dos ácidos graxos que entram nos enterócitos depende do comprimento da cadeia

Ácidos graxos de cadeias média e curta (com menos de 10 átomos de carbono) passam diretamente pelas células epiteliais para o sistema porta-hepático. Ao contrário, ácidos graxos com mais de 12 átomos de carbono são ligados a uma proteína de ligação de ácidos graxos e transferidos ao retículo endoplasmático rugoso do enterócito para a ressíntese de TAG. O glicerol usado para esse processo é obtido tanto pelos 2-MAG absorvidos (a via dos MAG, Fig. 10.6) como pela hidrólise de 1-MAG, que produz glicerol livre, ou pela via glicerol- 3 -fosfato produzido durante a glicólise (via do ácido fosfatídico; Fig. 10.6). O glicerol produzido no lúmen intestinal não é reutilizado no enterócito para a síntese de TAG, passando diretamente para o sistema porta.

A síntese de triacilglicerol requer ativação dos ácidos graxos

A ativação de ácidos graxos é realizada pela produção de derivados de acil-CoA pela acil-CoA sintetase. Todos os ácidos graxos de cadeia longa absorvidos pelas células epiteliais do intestino são reutilizados para formar TAG antes de serem transferidos ao sistema linfático como quilomícrons. Quilomícrons são partículas grandes, contendo 99% de lipídios e 1% proteína. Eles são estruturados dentro dos enterócitos no retículo endoplasmático rugoso antes de serem liberados no espaço intercelular por exocitose e finalmente saírem do intestino através do sistema linfático (Cap. 18).

DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantidade total de proteínas recebida pelo intestino vem de duas fontes principais: 70-100 g por dia provenientes da dieta e 35-200 g de proteína endógena. Esta última é secretada dentro do intestino (principalmente enzimas) ou liberada no epitélio como resultado da renovação cíclica das células. A digestão e a absorção de proteínas são extremamente eficientes: dessa grande quantidade, apenas 1-2 g do nitrogênio, equivalente a 6-12 g de proteínas, são perdidos nas fezes diariamente.

Proteínas são hidrolisadas por peptidases

As proteínas são quebradas por hidrólise das ligações peptídicas e, por isso, as enzimas envolvidas são denominadas peptidases. Essas enzimas podem tanto clivar ligações peptídicas internas (endopeptidases) quanto retirar um aminoácido por vez do –COOH –ou –NH 2 terminal do polipeptídeo (exopeptidases subclassificadas como carboxipeptidases e aminopeptidases, respectivamente). As endopeptidases quebram polipeptídeos grandes em oligopeptídeos menores, os quais são atacados por exopeptidases para produzir os produtos finais da digestão de proteínas, aminoácidos e di e tripeptídeos, que são então absorvidos pelos enterócitos. Dependendo da fonte das peptidases, a digestão proteica pode ser dividida em fases gástrica, pancreática e intestinal (Fig. 10.8, Tabela 10.2).

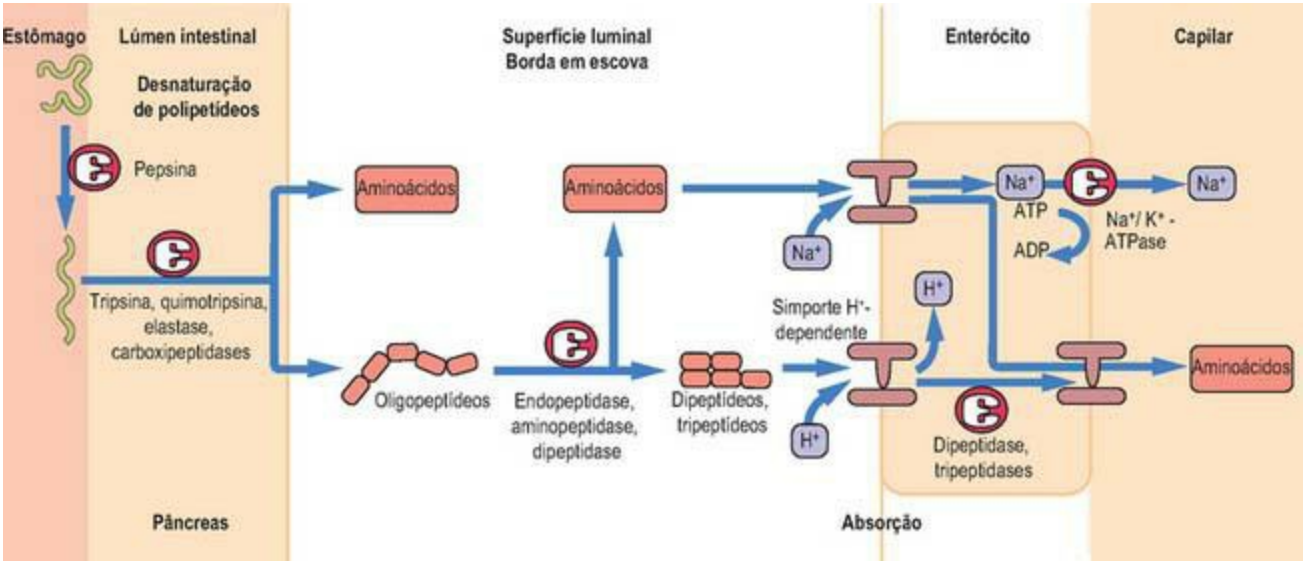


Fig. 10.8 Digestão e absorção de proteínas da dieta. O estágio preliminar para a digestão é a desnaturação de proteínas, a qual ocorre no estômago. As ligações peptídicas entre os aminoácidos são hidrolisadas pelas endo e exopeptidases. Aminoácidos simples e di e tripeptídeos são absorvidos por vários sistemas de transporte localizados nas membranas dos enterócitos.

Tabela 10.2 Enzimas que digerem as proteínas.

Fonte	Zimogênio/enzima	Ativação	Substrato	Produto final
estômago (fundo)	pepsinogênio A	HCl	proteína	peptídeos
estômago (piloro)	pepsinogênio B	pH 1-2 autoativação	proteína	peptídeo
pâncreas	tripsinogênio	enteropeptidase, tripsina	proteína, peptídeos	dipeptídeos, polipeptídeos
	quimotripsinogênio	tripsina	proteína, peptídeos	dipeptídeos, polipeptídeos
	pró-elastase	tripsina	proteína, peptídeos	dipeptídeos, polipeptídeos
	pró-carboxipeptidases	tripsina	polipeptídeos a partir da COOH	terminal pequenos peptídeos, aminoácidos
intestino delgado	aminopeptidase	sem precursor inativo	polipetídeos a partir da NH_2 terminal, dipeptídeos	pequenos peptídeos, aminoácidos
	dipeptidases, endopeptidases	sem precursor inativo	polipetídeos	pequenos peptídeos, dipeptídeos

A digestão proteica começa no estômago

O HCl secretado no estômago reduz o pH para 1-2 com consequente desnaturação das proteínas da dieta. A desnaturação torna as proteínas mais acessíveis à atividade de proteases por desenovelar a cadeia polipeptídica. Além disso, as pepsinas são secretadas pelas células principais da mucosa gástrica. Estas são as únicas proteínas com estabilidade ao ácido. Elas são liberadas como precursores inativos, os pepsinogênios I e II, e são ativadas por uma reação intramolecular (autoativação) em pH menor que 5 ou por uma pepsina ativa (autocatálise). Em pH acima de 2, o peptídeo liberado permanece ligado à pepsina e atua como inibidor da atividade da pepsina. Essa inibição acaba quando há uma diminuição do pH para menos de 2 ou por ação posterior da pepsina. Os produtos principais da digestão das proteínas pela pepsina são os grandes fragmentos de peptídeos e uns poucos aminoácidos livres. A proteína digerida no estômago, por sua vez, estimula a liberação de colecistocinina no duodeno, iniciando a liberação das principais enzimas digestivas pelo pâncreas.

Enzimas proteolíticas são liberadas pelo pâncreas na forma de zimogênios inativos, de maneira similar ao pepsinogênio. A enteropeptidase duodenal converte o tripsinogênio à sua forma ativa, a tripsina. Essa enzima é, então, capaz de autoativação e ativação de todos os outros zimogênios pancreáticos, assim ativando quimotripsina, elastase e carboxipeptídeos A e B. Devido a essa função importante da tripsina na ativação de outras enzimas pancreáticas, sua atividade é controlada no pâncreas e nos ductos pancreáticos por um peptídeo inibitório de baixo peso molecular.

TRANSPORTE ATIVO DE AMINOÁCIDOS PARA AS CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS

Mecanismos de transporte ativo de aminoácidos e de di e tripeptídeos para as células epiteliais intestinais são semelhantes aos descritos para a absorção de glicose. Na membrana de borda em escova, simportes Na + -dependentes, que medeiam a absorção de aminoácidos, estão ligados à bomba ATP-dependente, que transporta o Na + para fora da membrana contraluminal. Um simporte similar H + -dependente está presente na superfície da borda em escova para o transporte ativo de di e tripeptídeos para dentro da célula. Transportadores Na + -independentes estão presentes na superfície contraluminal, o que permite o transporte facilitado de aminoácidos ao sistema porta-hepático (Cap. 8).

Tanto em estudos genéticos como em de transportadores foram identificados pelo menos seis sistemas específicos de simportes para a absorção de L -aminoácidos do lúmen intestinal:

- Simporte de aminoácidos neutros com cadeias polares ou curtas (Ser, Thr, Ala)
- Simporte de aminoácidos neutros com cadeias aromáticas ou hidrofóbicas (Phe, Tyr, Met, Val, Leu, Ileu)
- Simporte de iminoácidos (Pro, OH-Pro)
- Simporte de aminoácidos básicos (Lys, Arg, Cys)
- Simporte de aminoácidos ácidos (Asp, Glu)
- Simporte de β -aminoácidos (β -Ala, Tau)

Esses sistemas de transportes estão também presentes nos túbulos renais, e defeitos na sua estrutura molecular podem causar doenças (p. ex., doença de Hartnup, uma desordem herdada com problemas de absorção intestinal de aminoácidos e perda de aminoácidos neutros pela urina, descrita no quadro da pág. 89).

DOENÇA CELIACA

Um homem de 22 anos de idade apresentou histórico de perda de peso, diarreia, distensão abdominal e anemia. Ele apresentava fezes claras e grossas. Os testes laboratoriais mostraram hemoglobina de 90 g/L (9 g/dL) (faixa de referência: 130-180 g/L; 13-18 g/dL). A biópsia do intestino delgado mostrou achatamento da superfície mucosa, atrofia das vilosidades e desaparecimento de microvilosidades. O diagnóstico de enteropatia induzida pelo glúten ou doença celíaca foi feito. Todos os produtos contendo trigo foram removidos da dieta do paciente, e os sintomas desapareceram.

Comentário. A doença celíaca á uma condição autoimune caracterizada por má absorção e alterações diagnósticas específicas exibidas pela mucosa intestinal. Uma vez que a superfície de absorção está bastante reduzida, a resultante indigestão/má absorção é grave. As alterações histológicas ocorrem devido à interação entre o glúten, a proteína principal do trigo, e o epitélio. Existem evidências que sugerem que a deficiência está localizada dentro das células da mucosa intestinal, o que permite que polipeptídeos que resultaram da digestão péptica e tríptica do glúten exerçam não somente efeitos locais prejudiciais dentro do intestino mas também que sejam absorvidos e induzam uma resposta imune. Os anticorpos circulantes contra o glúten do trigo e suas frações estão frequentemente presentes em casos de doença celíaca. O uso de testes específicos e sensíveis para a avaliação sorológica, como anticorpos antiendomísio da subclasse IgA tem mostrado que a doença celíaca é subdiagnosticada, especialmente em pacientes com anemia não explicada.

Para obster valores de referência hematológicos, consulte a Tabela 5.2, na pág. 56.

INTOLERNCIA À LACTOSE

Um menino afro-americano de 15 anos de idade foi ao Reino Unido fazer parte de um intercâmbio

de dois meses. Depois de duas semanas no Reino Unido, apresentou desconforto abdominal, inchaço, poliúria e, mais recentemente, diarreia. A única mudança na sua dieta foi a introdução de leite. Ele desenvolveu um gosto considerável por leite e tomava 1-2 caixas por dia. Um teste de intolerância à lactose foi realizado, no qual o jovem ingeriu 50 g de lactose em um veículo aquoso. Os níveis de glicose do plasma, medidos de 30 em 30 minutos, não subiram mais de 1 mmol/L (18 mg/dL) durante as duas horas subsequentes. Foi feito um diagnóstico de intolerância à lactose.

Comentário. A intolerância à lactose é uma mudança fisiológica que resulta de uma deficiência adquirida de lactase. A atividade da lactase diminui com o aumento da idade das crianças, mas a extensão da queda da atividade depende de fatores genéticos e étnicos. A deficiência de lactase na população de adultos negros varia entre 45%-95%. Se ocorrerem sintomas de má absorção após a introdução do leite na dieta dos adultos, o diagnóstico de deficiência adquirida de lactase deve ser considerado. O diagnóstico é feito testando o intestino delgado com lactose e monitorando a subida de glicose no plasma. Um aumento maior que 1,7 mmol/L (30 mg/dL) é considerado normal. Um aumento menor que 1,1 mmol/L (20 mg/dL) é diagnóstico de deficiência de lactase. Um aumento de 1,1-1,7 mmol/L (20-30 mg/dL) é inconclusivo.

Proteases pancreáticas têm diferentes especificidades para substratos com relação à clivagem das ligações peptídicas

A tripsina cliva as proteínas nos resíduos de lisina e arginina, a quimotripsina nos aminoácidos aromáticos, e a elastase, nos aminoácidos hidrofóbicos. O efeito combinado dessas enzimas pancreáticas é o de produzir uma abundância de aminoácidos livres e peptídeos de baixo peso molecular, de dois a oito resíduos de comprimento.

Em associação à secreção de proteases, o pâncreas também produz grande quantidade de bicarbonato de sódio. Isso resulta na neutralização do conteúdo ácido do estômago, à medida que eles chegam no duodeno, promovendo a atividade de proteases pancreáticas.

O final da digestão de peptídeos é dependente de peptidases do intestino delgado

A digestão final de di e oligopeptídeos é dependente das endopeptidases, dipeptidases e aminopeptidases ligadas à membrana do intestino delgado. Os produtos finais da atividade dessas enzimas de superfície são aminoácidos livres e di e tripeptídeos, que podem ser absorvidos através da membrana do enterócito por transporte específico mediado por carreadores. Di e tripeptídeos são posteriormente hidrolisados dentro do enterócito em seus aminoácidos constituintes. A etapa final é, então, a transferência dos aminoácidos livres do enterócito para o sistema porta.

Resumo

- A absorção e a digestão de alimentos fazem que combustíveis metabólicos fiquem disponíveis para o organismo.
- Carboidratos são digeridos em açúcares simples.
- Gorduras são hidrolisadas em di e monoglicerídeos.
- Proteínas são hidrolisadas em di e tripeptídeos e aminoácidos livres.
- A digestão é uma série de processos nos quais os alimentos são preparados para absorção.
- Defeitos nesses mecanismos resultam em uma variedade de síndromes de má absorção e de intolerância alimentar.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Descreva o processo de digestão do amido.
2. Discuta as possíveis complicações do vômito persistente.
3. Quais são os hormônios que ajudam na digestão?
4. Liste os produtos da secreção do estômago.
5. Esboce os mecanismos do transporte de açúcares no intestino delgado.
6. Qual é o papel das micelas na digestão das gorduras?

Leituras sugeridas

Baumgart D, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007;369:1627-1640.

Broer A, Cavanaugh JA, Rasko JEJ, Broer S. The molecular basis of neutral aminoacidurias. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2006;451:511-517.

Drozdowski LA, Thomson ABR. Intestinal sugar transport. *World J Gastroenterol*. 2006;12:1657-1670.

Hou W, Schubert ML. Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol*. 2006;22:593-598.

Micronutrientes: Vitaminas e Minerais

M.H. Dominiczak

I. Broom

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever as vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis.
- Discutir as ações e fontes vitamínicas.
- Discutir os sinais e sintomas das deficiências vitamínicas.
- Descrever o papel dos oligoelementos no metabolismo.

INTRODUÇÃO

Muitas vitaminas e oligoelementos são nutrientes essenciais. Deficiências de micronutrientes levam a síndromes clínicas específicas. Elas podem ser causadas por desnutrição ou se manifestam durante doenças. Elas estão intimamente ligadas às síndromes de má absorção e podem também ocorrer como resultado de complicações de cirurgias no trato gastrointestinal. Deficiências múltiplas de micronutrientes são muito mais comuns que deficiências isoladas. Este capítulo deve ser lido em conjunto com o capítulo 22.

A maioria das vitaminas age como coenzimas, por exemplo, a riboflavina nas reações de oxidorredutase e a biotina nas reações de carboxilação. Classificamos as vitaminas em lipossolúveis e hidrossolúveis. As vitaminas lipossolúveis são as vitaminas A, D, E e K, e as vitaminas hidrossolúveis são as vitaminas B_1, B_2, B_3, B_5, B_6, B_{12}, folato, biotina e vitamina C.

Muitos oligoelementos são também nutrientes essenciais

Muitos dos oligoelementos, por exemplo, zinco, manganês e magnésio, são grupos prostéticos de metaloenzimas. Essas enzimas, por sua vez, perdem suas funções biológicas sem seus grupos prostéticos. Alguns oligoelementos como cádmio, mercúrio e alumínio podem ser encontrados na cadeia alimentar e são citotóxicos. Outros oligoelementos essenciais, por exemplo, o cobre e o manganês, podem ser tóxicos em excesso.

Recomenda-se a ingestão de oligoelementos e vitaminas a fim de prevenir o desenvolvimento de patologias. As necessidades vitamínicas dependem, de certa forma, da ingestão de macronutrientes (Cap. 22).

A desnutrição está geralmente associada a deficiências nutricionais múltiplas

A avaliação dos níveis corporais dos micronutrientes é difícil por várias razões. A medidas das concentrações de vitaminas hidrossolúveis circulantes são inapropriadas, porque esses níveis se relacionam com a ingestão recente e não refletem o estado corporal geral. A medida das atividades das enzimas associadas às vitaminas particulares tem sido sugerida como a avaliação mais apropriada. Isso é geralmente realizado em testes de estimulação, ou seja, aqueles em que a atividade de uma enzima é medida na ausência e na presença da vitamina. A deficiência vitamínica é reconhecida se a atividade da enzima estiver aumentada na presença da vitamina.

Existem também problemas com a interpretação das concentrações circulantes das vitaminas lipossolúveis. Elas estão associadas à gordura corporal e são frequentemente armazenadas nos tecidos, com concentrações circulantes mantidas relativamente constantes: por exemplo, a vitamina A é armazenada no fígado e é transportada no plasma por proteínas ligantes específicas. Um decréscimo dos níveis de um nutriente no sangue ou plasma não indica necessariamente uma deficiência pode ser simplesmente reflexo de uma resposta metabólica ao estresse ou uma mudança no estado fisiológico, tal como a gravidez. Da mesma maneira, as concentrações circulantes dos oligoelementos têm pouca relação com o estado nutricional. Para a avaliação de toxicidade dos oligoelementos, outros tecidos além do sangue devem ser analisados antes que um diagnóstico de envenenamento por metal seja feito.

VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS

As vitaminas lipossolúveis são armazenadas nos tecidos

As vitaminas lipossolúveis não são absorvidas ou extraídas da dieta tão prontamente quanto as vitaminas hidrossolúveis; todavia, quantidades consideráveis são armazenadas nos tecidos. Com exceção da vitamina K, elas não atuam como coenzimas. As vitaminas A e D se comportam mais como hormônios. Observe que a vitamina A e a vitamina D, mas não as vitaminas E e K, podem ser tóxicas em excesso.

Vitamina A

"Vitamina A" é um termo genérico utilizado para definir três compostos: retinol, retinal e ácido retinoico, todos encontrados em animais. O mais ativo desses derivados é o ácido retinoico. O termo "retinoides" tem sido usado para definir essas três substâncias, como outros compostos sintéticos associados com atividades semelhantes à vitamina A. A pró-vitamina da vitamina A é o β-caroteno, encontrado nos alimentos vegetais. No intestino delgado, o β-caroteno é hidrolisado e convertido em todo-*trans*-retinal pela ação da β-caroteno dioxigenase. O metabolismo subsequente realizado nos enterócitos produz retinol e ácido retinoico (Fig. 11.1), que são transportados para o fígado para armazenamento.

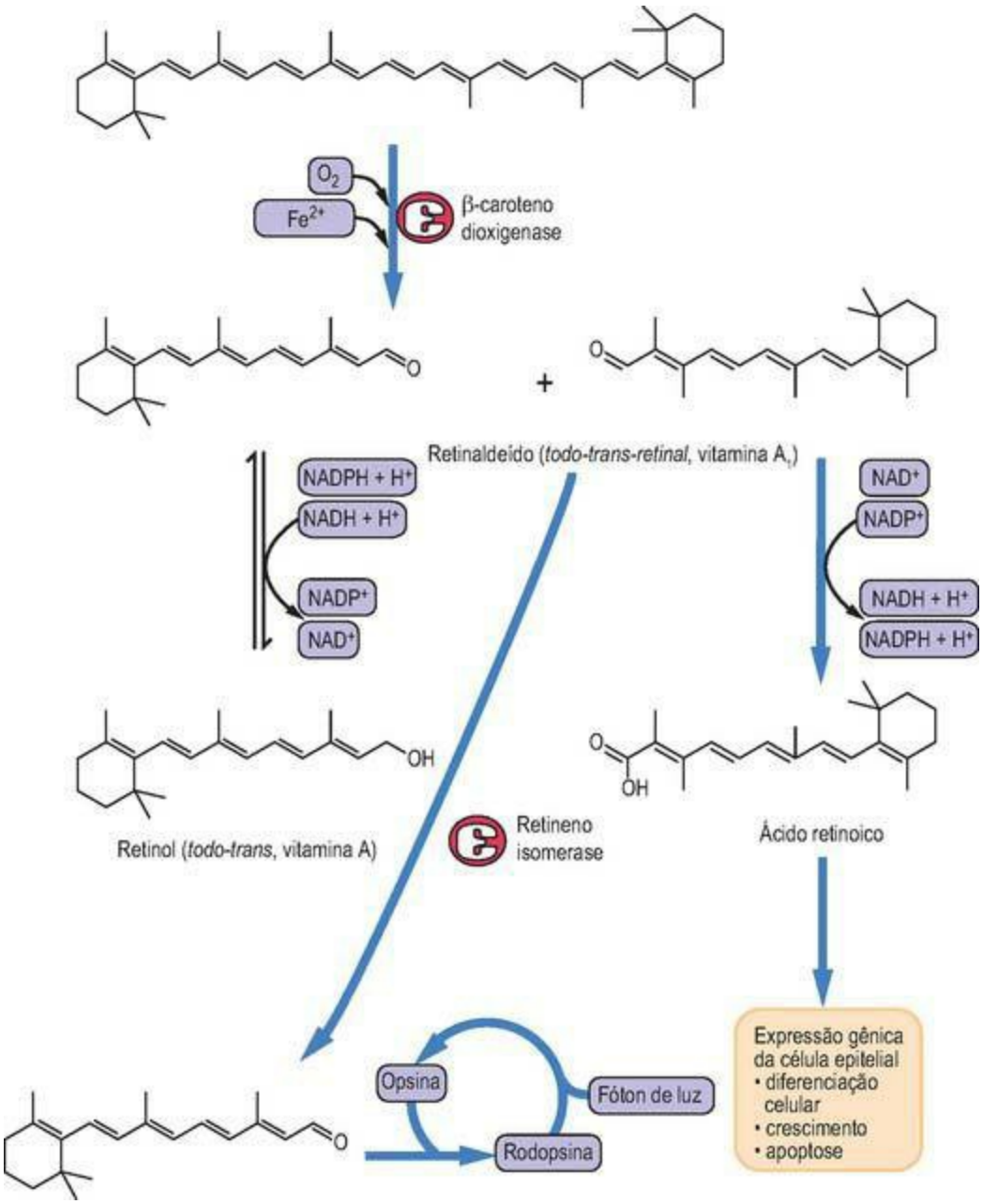


Fig. 11.1 Estrutura, metabolismo e função da vitamina A. A conversão do retinaldeído a ácido retinoico é irreversível (Cap. 40).

A vitamina A é armazenada no fígado e precisa ser transportada aos seus locais de ação

A vitamina A é armazenada no fígado na forma de retinol e ésteres de retinol (palmitato de retinol) e ligando-se às proteínas citosólicas de ligação do retinol (CRBP, do inglês *cytosolic retinol-binding proteins*). O retinol é excretado pelo fígado ligado à proteína sérica de ligação ao retinol (RBP, do inglês *retinol binding protein*). Considera-se que o ácido retinoico seja transportado tanto para as células ligado à albumina quanto para a proteína específica de ligação ao ácido retinoico (RABP, do inglês *retinoic acid-binding protein*). O retinol é captado pelas células por um receptor de membrana.

O ácido retinoico é uma molécula sinalizadora que interage com fatores de transcrição ativados por ligantes, os receptores retinoides nucleares. Os receptores de ácidos retinoides (RAR, do inglês *retinoid acid receptors*) se ligam aos isômeros todo-*trans* e 9-*cis do ácido retinoico*, enquanto os chamados receptores rexinoides (RXR) se ligam somente ao isômero 9-cis. Esses receptores podem formar heterodímeros. Receptores do tipo RXR podem também interagir com outros receptores nucleares, como aqueles da vitamina D_3, hormônios tireoidianos e receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs, do inglês *peroxisome proliferator-activated receptors*). O ácido retinoico também tem um papel no crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso central.

Vegetais verde-escuros e amarelos são boas fontes de β-ca-roteno. A conversão dos carotenoides em vitamina A é raramente 100% eficiente, e a potência dos alimentos é descrita em equivalentes de retinol (RE: 1 RE é igual a 1 mg de retinol ou 6 mg de β-caroteno ou, ainda, 12 mg de outros carotenos). As reservas hepáticas suprem as necessidades por aproximadamente um ano. Fígado, gema de ovo, mateiga e leite são boas fontes de vitamina A.

A deficiência de vitamina A se apresenta como cegueira noturna

O pigmento visual rodopsina é encontrado nos bastonetes da retina e é formado pela ligação do 11-*cis*-retinal à apoproteína opsina. Quando a rodopsina é exposta à luz, ela é clareada, e o retinal se dissocia, sendo isomerizado e reduzido a todo-*trans*-retinol (Fig. 11.1). Essa reação é acompanhada por uma mudança conformacional da molécula que produz um impulso nervoso percebido pelo cérebro como luz (Cap. 41). Os bastonetes são responsáveis pela visão com pouca luz.

A deficiência de vitamina A se apresenta como visão noturna anormal ou cegueira noturna. A vitamina A também influencia o crescimento e a diferenciação das células epiteliais; dessa forma, a deficiência produz epitelização anormal e xeroftalmia (queratinização da córnea). A deficiência severa da vitamina A leva à queratinização progressiva da córnea e à cegueira permanente, sendo a causa mundial mais comum de cegueira. A deficiência subclínica de vitamina A pode deixar o indivíduo mais suscetível a infecção. A deficiência ocorre principalmente nos países em desenvolvimento, mas também é bastante comum em pacientes com doença hepática grave ou má absorção lipídica.

Vitamina A em excesso é tóxica

A vitamina A é tóxica em excesso, com sintomas que incluem dor óssea, perda de cabelo, dermatite, hepatoesplenomegalia, náusea, vômito, visão dupla, dor de cabeça e diarreia. É impossível desenvolver toxicidade por vitamina A a partir da ingestão normal de alimentos; no entanto, a toxicidade pode ser resultado do uso de suplementos de vitamina A. O aumento da ingestão de vitamina A também está associado a teratogenicidade e deve ser evitado durante a gravidez.

Vitamina D

A vitamina D (calcitriol) é um hormônio propriamente dito. A ingestão de vitamina D faz-se necessária apenas em condições em que a exposição à luz solar é inadequada; ela é a única vitamina que não é usualmente necessária na dieta. Ela faz parte, na verdade, de um grupo muito próximo de esteróis e é produzida pela ação da luz ultravioleta (comprimento de onda de 290-310 nm) sobre provitaminas (ergosterol em plantas e 7-deidrocolesterol em animais; Fig. 11.2). O 7-deidrocolesterol é sintetizado no fígado e encontrado na pele. Os produtos da reação fotolítica são ergocalciferol (vitamina D_2) e colecalciferol (vitamina D_3), respectivamente. Eles são equipotentes. Ambos são convertidos em uma série de derivados hidroxilados. No fígado a hidroxilação ocorre na posição 25, produzindo o 25-hidroxicolecalciferol ($25(OH)D_3$; calcidiol) e posteriormente nos rins, ocorre uma outra hidroxilação na posição 1, produzindo o composto ativo 1α-,25-di-hidroxicolecalciferol ($1,25(OH)_2D_3$; calcitriol). Os detalhes do metabolismo da vitamina D são descritos no capítulo 25.

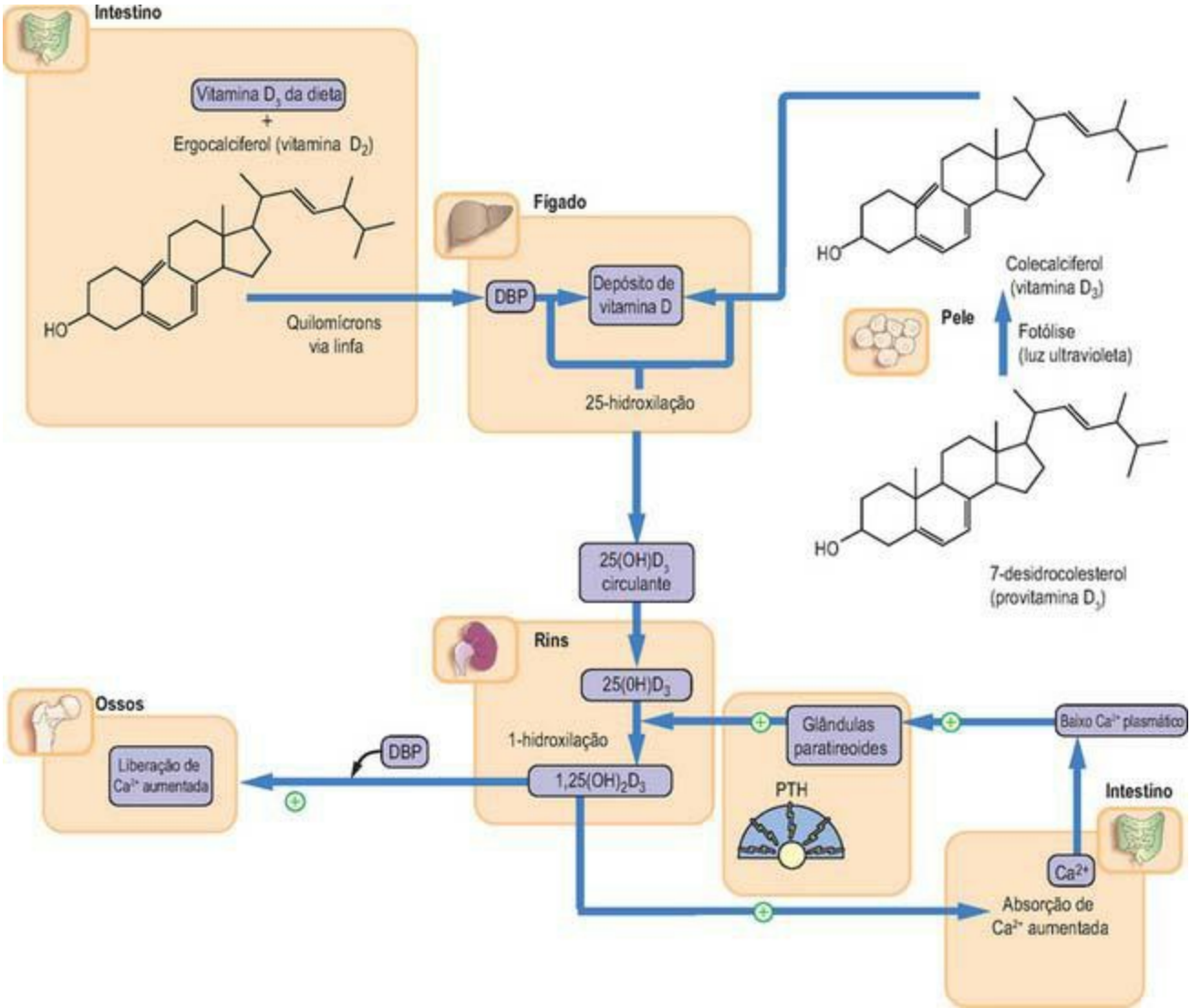


Fig. 11.2 Estrutura, função e metabolismo da vitamina D. PTH, hormônio da paratireoide; DBP, proteína de ligação da vitamina D.

A maior parte da ingestão da vitamina D se dá através da ingestão de leite e outros alimentos enriquecidos. Óleo de peixe, gema de ovo e fígado também são ricos em vitamina D. Insuficiente luz solar e metabolismo elevado da vitamina D devido a baixa ingestão ou absorção de cálcio podem levar à deficiência vitamínica. As demandas nutricionais de vitamina D são maiores no inverno devido aos menores tempos de exposição à luz solar.

A deficiência de vitamina D produz raquitismo em crianças e osteomalácia em adultos

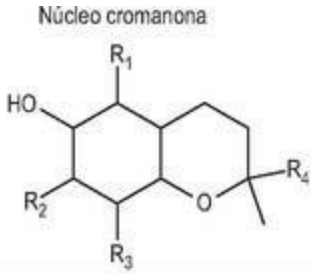
O raquitismo é caracterizado por ossos moles e flexíveis causado por uma mineralização defeituosa devido à deficiência de cálcio. Ocorre também o arqueamento característico das pernas e a formação do rosário raquítico em torno das junções costocondrais. No adulto, ocorre a desmineralização dos ossos preexistentes, aumentando a suscetibilidade a fraturas. A deficiência de vitamina D é também caracterizada por baixas concentrações circulantes de cálcio e aumento da atividade da fosfatase alcalina no soro (Cap. 25).

A vitamina D em excesso é tóxica

O excesso de vitamina D causa absorção de cálcio aumentada e reabsorção óssea, levando a hipercalcemia e deposição metastática de cálcio. Existe também uma tendência a desenvolver pedras nos rins devido à hipercalciúria secundária à hipercalcemia.

Vitamina E

A vitamina E da dieta é uma mistura de diversos compostos chamados tocoferóis. Noventa por cento da vitamina E presente nos tecidos humanos está na forma do isômero natural, α-tocoferol (Fig. 11.3). As fontes naturais mais ricas de vitamina E são os óleos vegetais e as sementes. No folclore europeu, a vitamina E foi associada à fertilidade e à atividade sexual. Isso é certamente verdade em outras espécies animais, nas quais a vitamina E tem um papel na produção de espermatozoides e na implantação do óvulo, mas não é o caso da espécie humana.



R_1–R_3			R_4
α-tocoferol	R_1,R_2,R_3,	Me	$-CH_2(CH_2-CH_2-\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{\vert}{CH}}-CH_2)_3-$
β-tocoferol	R_1,R_3,	Me	
γ-tocoferol	R_2,R_3,	Me	
δ-tocoferol	R_2,R_3,	Me	

Fig. 11.3 Estrutura da família da vitamina E (tocoferóis). R1-R3 podem ser metilados em uma variedade de combinações. A cadeia lateral de poliisoprenoide ocorre no R4; Me, metil.

A vitamina E é um antioxidante de membrana

A vitamina E é o antioxidante natural mais abundante e, devido à sua lipossolubilidade, está associada a todas as estruturas que têm lipídios presentes em sua composição: membranas, lipoproteínas e depósitos de gordura (Fig. 37.9). Ela é absorvida da dieta com outros componentes lipídicos e não existe uma proteína transportadora específica. Na circulação, está associada às lipoproteínas. A má absorção de gorduras reduz os níveis de vitamina E da gordura corporal e, após um período prolongado, sintomas neurológicos relacionados à privação da vitamina E têm sido relatados. A baixa ingestão de vitamina E durante a gravidez e por recém-nascidos pode levar à deficiência vitamínica. Isso é geralmente encontrado apenas em prematuros alimentados com fórmulas lácteas com baixo conteúdo de vitamina E. A deficiência de vitamina E em prematuros causa anemia hemolítica, trombocitose e edema. Existe pouca evidência confirmando a toxicidade por vitamina E em excesso.

A vitamina K é necessária para a coagulação sanguínea

A vitamina K faz parte de um grupo de substâncias nas quais o número de unidades de isoprenoides varia em sua cadeia lateral. Da mesma forma que a vitamina E, a absorção da vitamina K depende da absorção apropriada de gorduras. A estrutura, a nomenclatura e as fontes da vitamina K estão resumidas na Figura 11.4. A vitamina K circula como filoquinona, e suas reservas hepáticas estão na forma de menaquinonas. Ela é necessária para as modificações pós traducionais de várias proteínas (fatores II, VII, IX e X) na cascata de coagulação (Fig. 7.3). Todas essas proteínas são sintetizadas pelo fígado como precursores inativos e são ativadas pela carboxilação de resíduos específicos de ácidos glutâmicos (Glu) por uma enzima dependente de vitamina K (Fig. 11.5). A protrombina (fator II) contém 10 desses resíduos carboxilados e todos são necessários nessa proteína para a quelação específica de íons Ca^{2+} durante sua função na coagulação. Recentemente, outras proteínas contendo resíduos Glu dependentes de vitamina K, como a osteocalcina, foram identificadas nos tecidos. A vitamina K é amplamente distribuída na natureza: suas fontes dietéticas são vegetais de folhas verdes, frutas, laticínios, óleos vegetais, carnes e cereais.

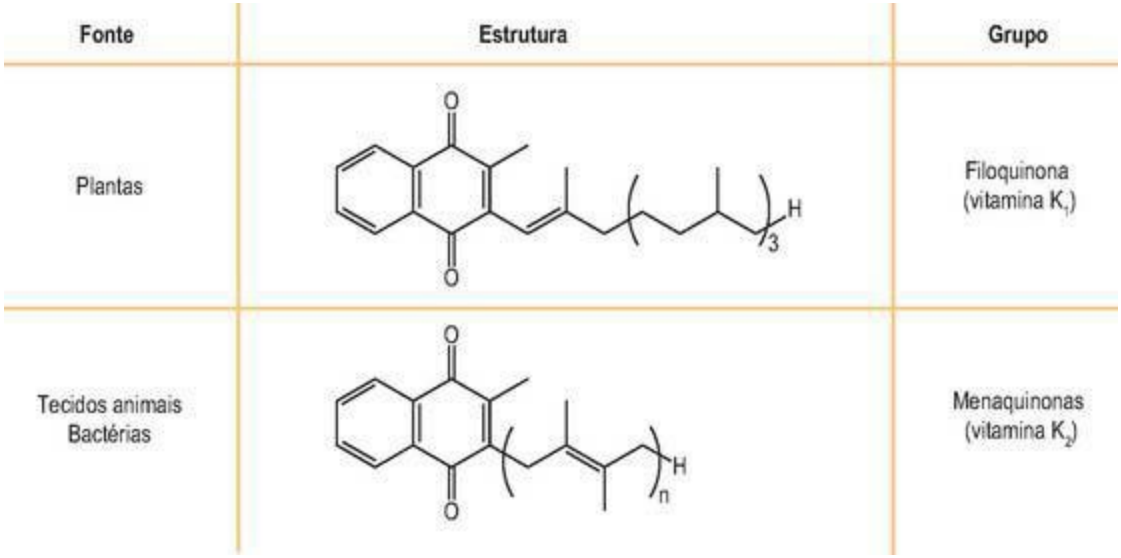


Fig. 11.4 Estrutura das diferentes formas de vitamina K.

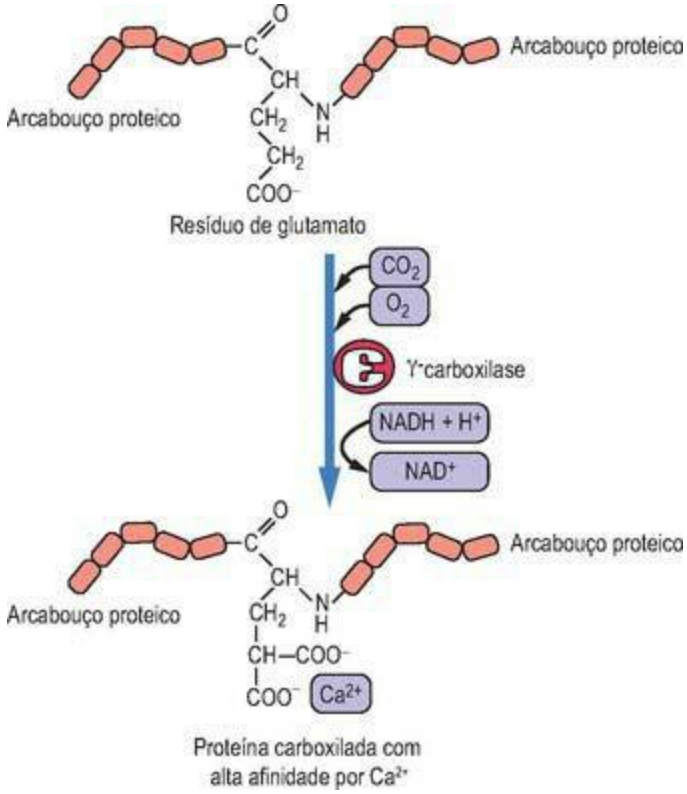


Fig. 11.5 Carboxilação dos resíduos de glutamato mediada pela vitamina K. Essa reação produz resíduos carboxilados, os quais são necessários para a quelação do Ca^{2+}.

A deficiência de vitamina K causa distúrbios na coagulação sanguínea

A produção de vitamina K pela flora intestinal garante que a deficiência não ocorrerá no homem. No entanto, deficiências raras podem se desenvolver naqueles com doença hepática ou má absorção de gorduras, ou em recém-nascidos, e está associada com distúrbios na coagulação sanguínea. Crianças prematuras estão especialmente em risco e podem apresentar a doença hemorrágica do recém-nascido. A transferência placentária de vitamina K materna para o feto é ineficiente. Imediatamente após o nascimento, a concentração circulante diminui. Normalmente, ela se recupera pela absorção de alimentos, mas isso pode ser demorado em prematuros. Além disso, o trato intestinal do recém-nascido é estéril e, dessa forma, por vários dias após o nascimento não haverá fonte de vitamina K, que será fornecida posteriormente pela microflora intestinal.

Inibidores da ação da vitamina K são potentes drogas antitrombóticas

Inibidores específicos das carboxilações, as quais são dependentes de vitamina K, são usados no tratamento de doenças relacionadas à trombose, por exemplo, nos pacientes com trombose venosa profunda e tromboembolismo pulmonar, ou naqueles com fibrilação atrial com risco de trombose. Essas são as drogas do grupo dos dicumarínicos, por exemplo, a warfarina, que inibe a ação da vitamina K. Essa droga também é usada como veneno de rato, e a vitamina K é, portanto, o antídoto para a intoxicação humana por esse agente.

VITAMINAS HIDROSSOLÚVEIS

Vitaminas do complexo B

As vitaminas do complexo B atuam como coenzimas em várias vias metabólicas

Com exceção da vitamina B_{12}, o corpo não possui capacidade de armazenar as vitaminas hidrossolúveis. Consequentemente, todas as vitaminas hidrossolúveis devem ser regularmente obtidas através da dieta. Todo o excesso dessas vitaminas é excretado pela urina. Ao contrário das vitaminas lipossolúveis, não apresentam toxicidade se ingeridas em excesso.

As vitaminas do complexo B são essenciais ao metabolismo normal e funcionam como coenzimas em várias reações. As vitaminas do complexo B e suas deficiências estão listadas na Figura 11.6. Os pacientes geralmente apresentam múltiplas deficiências; deficiência causada pela falta de uma única vitamina do complexo B é rara.

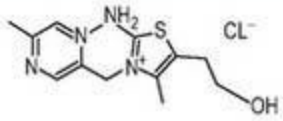
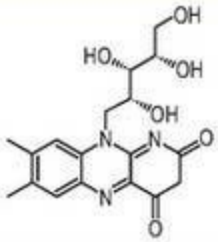
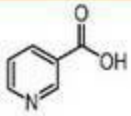
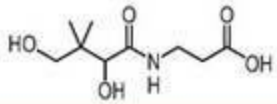
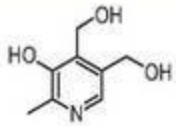
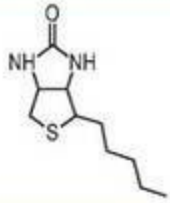
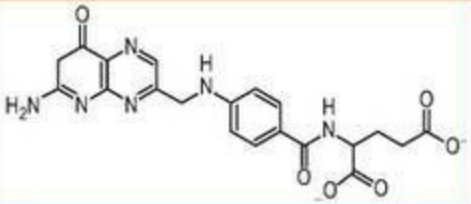
Vitamina	Estrutura	Doença causada pela deficiência	Fonte alimentar
Tiamina (vit. B_1)		Beribéri	Sementes, frutos secos, gérmen de trigo, legumes, carne magra
Riboflavina (vit. B_2)		Pelagra	Carnes, frutos secos, legumes
Niacina (vit. B_3)		Pelagra	Carnes, frutos secos, legumes
Ácido pantotênico (vit. B_5)			Levedura, grãos, gema de ovo, fígado
Piridoxina (vit. B_6)		Doença neurológica	Levedura, fígado, gérmen de trigo, nozes, feijões, bananas
Biotina		Lesões generalizadas	Milho, soja, gema de ovo, fígado, rins, tomates
Folato		Anemia	Levdura, vegetais verde
Cobalamina (vit. B_{12})	Complexo	Anemia perniciosa	Fígado, rins, ovos, queijo

Fig. 11.6 Estrutura, fontes e doenças causadas por +deficiências das vitaminas +do complexo B.

Tiamina (vitamina B_1)

A tiamina é essencial para as reações de descarboxilação

A tiamina, em sua forma ativa como tiamina-pirofosfato, é essencial para reações de descarboxilação, para algumas reações catalisadas por transferases e para o metabolismo energético normal dos carboidratos. A tiamina é necessária para a reação da transcetolase na via da hexose monofosfato (Cap. 12). Embora as vias que exijam tiamina sejam bem estabelecidas, suas falhas nos

estados de deficiência e os seus sinais e sintomas de deficiência não são claramente relacionados.

A deficiência de tiamina está associada ao alcoolismo

Os sintomas iniciais da deficiência de tiamina são perda de apetite, constipação e enjoo. Eles podem progredir para depressão, neuropatia periférica e tremores, os últimos relacionados com a disfunção da célula nervosa. A deterioração adicional dos níveis de tiamina resulta em confusão mental (perda da memória recente), ataxia e perda da coordenação ocular. Essa combinação, geralmente vista em pacientes alcoólatras, é conhecida como psicose de Wernicke-Korsakoff. A deficiência severa de tiamina resulta em beribéri, ou "seca" (sem retenção de fluidos) ou "úmida" (associada à insuficiência cardíaca com edema). O beribéri é caracterizado primariamente por sintomas neuromusculares e ocorre em populações que contam apenas com arroz polido como alimento. O beribéri "úmido" é particularmente associado ao alcoolismo. Os sinais e sintomas da deficiência podem ser vistos nos idosos e nos grupos de baixa renda com dieta pobre em vitaminas. Os testes usados para detectar os níveis de tiamina incluem a medida da transcetolase eritrocitária e a medida direta, através da cromatografia líquida de alta pressão.

Quanto maior a ingestão calórica, maior a necessidade de vitaminas do complexo B

As doenças associadas com alta necessidade calórica requerem maior ingestão de tiamina e de outras vitaminas do complexo B. O aumento do fornecimento calórico, em particular de carboidratos, exige quantidades maiores de vitaminas do complexo B. Dessa forma, é possível que o beribéri se desenvolva em dietas ricas em carboidratos.

Riboflavina (vitamina B_2)

A riboflavina está associada às oxidorredutases

A riboflavina está ligada ao açúcar álcool ribitol. A molécula é colorida, fluorescente, fotolábil e termoestável. É encontrada em oxidorredutases como flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), e é necessária ao metabolismo energético tanto de açúcares quanto de lipídios (Cap. 9). A ativação da riboflavina ocorre via sistema enzimático dependente de ATP, resultando na produção de FMN e FAD.

A falta de riboflavina na dieta causa uma síndrome de deficiência com inflamação dos cantos da boca (estomatite angular), inflamação da língua (glossite) e dermatite de descamação, além de algum nível de fotofobia. Por causa de sua sensibilidade luminosa, a deficiência de riboflavina pode ocorrer em recém-nascidos com icterícia, os quais são tratados com fototerapia. O hipotireoidismo também afeta a conversão de riboflavina em FMN e FAD. As medidas da atividade da glutationa redutase eritrocitária são usadas para determinar os níveis de riboflavina.

Niacina (vitamina B_3)

A niacina é necessária para a síntese de NAD^+ e $NADP^+$

A niacina é um nome genérico para o ácido nicotínico ou nicotinamida e ambos são nutrientes essenciais.

A niacina é uma parte ativa da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ($NADP^+$), os quais participam das reações da

oxidorredutase. A forma ativa da vitamina necessária para a síntese de NAD^+ e $NAPD^+$ é o nicotinato, e portanto a nicotinamida deve ser desaminada antes de tornar-se disponível para a síntese dessas coenzimas. A niacina pode ser sintetizada a partir do triptofano e, portanto, não é uma vitamina propriamente dita. A conversão é, entretanto, muito ineficiente e não consegue suprir quantidades suficientes de niacina. Além disso, a conversão requer tiamina, piridoxina e riboflavina, e em dietas pobres tal síntese seria problemática. As exigências de niacina estão também relacionadas com o gasto energético.

A deficiência severa de niacina ocasiona dermatite, diarreia e demência

A deficiência de niacina inicialmente produz glossite superficial, mas pode progredir para pelagra, que é caracterizada por dermatite, lesões de pele semelhantes a queimaduras solares nas áreas corporais expostas ao sol e a pressão, além de diarreia e demência. A pelagra é fatal, se não tratada. Algumas drogas, como por exemplo a droga anti-tuberculose isoniazida, predispõe à deficiência de niacina. Altas doses de niacina podem causar hepatotoxicidade, que é reversível com a retirada da vitamina. No mundo moderno, a pelagra é considerada uma raridade médica.*

Piridoxina (vitamina B_6)

A piridoxina é importante para o metabolismo dos aminoácidos

A vitamina B_6 é uma mistura de piridoxina, piridoxal, piridoxamina e seus 5′-fosfatos. A piridoxina é a principal forma da vita-mina B_6 na dieta, e o fosfato de piridoxal é a forma ativa da vitamina. O piridoxal fosfato participa como cofator no metabolismo dos aminoácidos e também na reação da fosforilase do glicogênio (Fig 19.2).

Todas as formas da vitamina são absorvidas pelo intestino, e durante esse período ocorre alguma hidrólise dos fosfatos. A maioria dos tecidos, no entanto, contêm a piridoxal quinase, que ressintetiza as formas fosforiladas necessárias para síntese, metabolismo e interconversão dos aminoácidos (Cap. 19). A piridoxina também é necessária para a síntese dos neurotransmissores serotonina e noradrenalina (Cap. 42 e quadros da pág. 589), além da síntese de esfingosina, um componente da esfingomielina e dos esfingolipídios (Cap. 27). A piridoxina também é necessária para a síntese do grupamento heme (Cap. 29).

A necessidade de vitamina B6 aumenta com a ingestão elevada de proteínas

Por causa de seu papel no metabolismo dos aminoácidos, as necessidades diárias de vitamina B_6 aumentam com o aumento da ingestão de proteínas. A deficiência de vitamina B_6, em sua forma mais branda, causa irritabilidade, nervosismo e depressão, progredindo na deficiência severa para neuropatia periférica, convulsões e coma. A deficiência severa está associada também à anemia sideroblástica. A droga isoniazida, por se ligar à piridoxina, bem como a pílula contraceptiva, por aumentar a síntese das enzimas que requerem a vitamina, podem antecipar a deficiência vitamínica. A neuropatia periférica está também associada ao tratamento com isoniazida. O debate em relação à pílula contraceptiva continua, mas geralmente se aceita que haja um aumento na necessidade de ingestão de piridoxina. A avaliação dos níveis de piridoxina é baseada na medida dos níveis da enzima aspartato aminotransferase eritrocitária.

Biotina

A biotina é importante para as reações de carboxilação

A biotina é normalmente sintetizada pela flora intestinal. Ela funciona como coenzima em complexos multienzimáticos envolvidos nas reações de carboxilação (Fig. 14.4). Ela é importante na lipogênese, na gliconeogênese e no catabolismo de aminoácidos de cadeias ramificadas. A maior parte da necessidade de biotina no organismo é suprida a partir de sua síntese pelas bactérias intestinais. O consumo de ovos crus pode causar deficiência de biotina, uma vez que a proteína da clara do ovo (avidina), se liga à biotina, impedindo sua absorção. Curiosamente, certas deficiências hereditárias isoladas ou múltiplas das enzimas carboxilases podem também levar à síndrome de deficiência de biotina aparente. Os sintomas da deficiência de biotina incluem depressão, alucinações, dor muscular e dermatite. Crianças com múltiplas deficiências das enzimas descarboxilases também exibem imunodeficiência.

Ácido pantotênico

O ácido pantotênico é uma parte da molécula de coenzima A (CoA)

O ácido pantotênico é amplamente encontrado em animais e plantas. Não há evidência de deficiência no homem, exceto em dietas experimentais.

Ácido fólico

Os derivados do ácido fólico são importantes nas reações de transferência de um único átomo de carbono

O ácido fólico (ácido pteroil glutâmico) tem um número de derivados conhecidos coletivamente como folatos. Ele participa em reações de transferências de um único átomo de carbono, por exemplo, as reações de metilação, importantes tanto no metabolismo quanto na regulação da expressão gênica, em múltiplas vias, incluindo a síntese de colina, serina, glicina, metionina e ácidos nucleicos. A deficiência de folato contribui para a hiper-homocisteinemia, a qual foi associada com o aumento do risco de doença cardiovascular. O ácido fólico é fisiologicamente inativo até ser reduzido a ácido di-hidrofólico. Suas formas principais são tetraidrofolado, 5-metil-tetraidrofolato (N^5MeTHF) e N^{10}-formiltetraidrofolato-poliglutamato derivado do 5MeTHF, encontrado predominantemente nos alimentos frescos. Antes dos poliglutamatos poderem ser absorvidos, eles devem ser hidrolisados pela glutamil hidrolase (conjugase) no intestino delgado. A principal forma circulante de folato é o monoglutamato N^5-THF. Polimorfismos associados com variantes do gene da 5,10-metilenotetraidrofolato redutase, uma enzima-chave no metabolismo do folato, estão associados a doenças como câncer de cólon, espinha bífida e leucemia linfocítica aguda nos adultos.

O ácido fólico é necessário para a síntese de DNA

Células em rápido processo de divisão têm maior necessidade dessa vitamina, já que exercem importante função na síntese de timina das purinas e pirimidinas, as quais são necessárias para a síntese de DNA (Cap. 31 e quadro da pág. 411). Com base na toxicidade seletiva que ocorre em células de crescimento rápido, por exemplo nas células bacterianas e cancerosas, essa função do folato foi a principal base para o desenvolvimento de análogos estruturais de folato (antagonistas do ácido fólico), os quais são utilizados como antibióticos (p ex., trimetoprima e agentes anticancerígenos (metotrexato). O ácido fólico é encontrado no fígado, fungos e em vegetais folhosos verdes. Ele é quantificado por cromatografia líquida de alta pressão (HLPC, do inglês, *high pressure liquid chormatography*).

A deficiência de folato causa anemia megaloblástica

A falha na sínstese de metionina e ácidos nucleicos nos estados de deficiência de folato é responsável pelos sinais e sintomas da anemia megaloblástica, isto é, a presença de blastócitos aumentados na medula óssea. A deficiência de folato é uma das deficiências vitamínicas mais comuns, e as anormalidades hematológicas associadas com essa deficiência não podem ser diferenciadas daquelas causadas pela deficiência de vitamina B_{12} (ver a seguir). As deficiências neurológicas são também similares. O bloqueio na síntese diminui a produção de eritrócitos, causando o aparecimento de eritrócitos aumentados (macrocíticos) com membranas frágeis e tendência à hemólise. Dessa forma, a anemia macrocítica segue em associação com a anemia megaloblástica.

Existem muitas causas para a deficiência de folato, incluindo ingestão inadequada, má absorção, metabolismo alterado e necessidade aumentada. Os exemplos mais comuns de necessidade aumentada ocorrem na gravidez e lactação. A necessidade de ácido fólico aumenta bastante quando o volume de sangue e o número de eritrócitos aumentam durante a gravidez. No terceiro trimestre de gravidez, a necessidade de ácido fólico duplica. No entanto, a anemia megaloblástica durante a

gravidez, mas não em gravidez múltipla, é rara. A prática comum é fornecer suplementação de folato durante a gravidez. A suplementação de folato durante o período periconceptivo (as definições desse período variam: a mais usada em estudos clínicos é de quatro semanas antes e oito semanas após a concepção) previne contra a ocorrência de espinha bífida; o fechamento do tubo neural ocorre entre 22-28 dias após a concepção. As deficiências de folato são vistas nos idosos como resultado de dieta pobre e/ou má absorção dessa vitamina.

Vitamina B_{12}

A vitamina B_{12} é parte da estrutura do grupamento heme

A vitamina B_{12} (cobalamina) tem uma complexa estrutura em anel similar ao sistema de porfirina do grupamento heme (Cap. 29), porém é mais hidrogenada. O ferro localizado no centro do anel do grupamento heme é substituído pelo íon cobalto (Co^{3+}). Essa é a única função conhecida do cobalto no corpo. Essencial para a quelação do íon cobalto, um anel dimetilbenzimidazol também faz parte da molécula ativa (Fig. 11.7). A vitamina B_{12} participa da reciclagem dos folatos e da síntese de metionina.

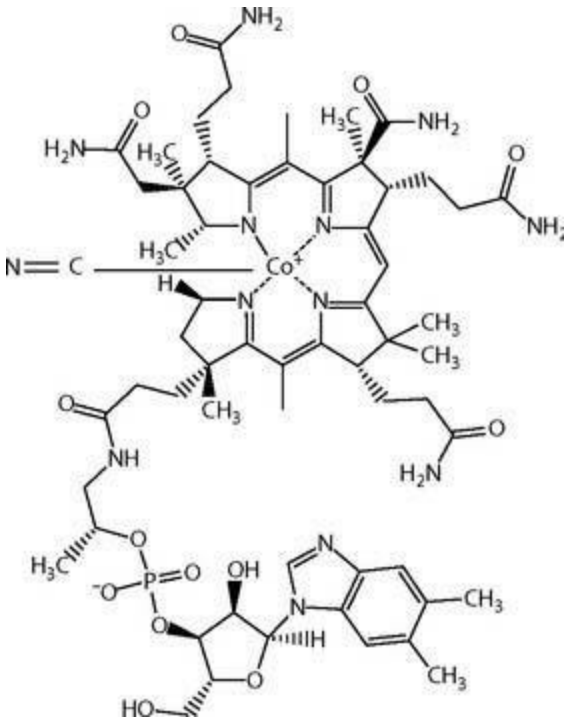


Fig. 11.7 Vitamina B_{12}. Há um grupo ciano (CN) ligado ao cobalto: esse é um artefato de extração, mas é também a forma mais estável da vitamina e é, de fato, o produto comercial disponível para tratamento. O grupo ciano necessita ser removido para a conversão à forma ativa da vitamina.

A vitamina B_{12} é sintetizada apenas por bactérias. Ela está ausente em todas as plantas, mas concentrada no fígado dos animais de três maneiras diferentes: metilcobalamina, adenosilcobalamina e hidroxicobalamina. O fígado é uma fonte útil dessa vitamina e foi usado no passado no tratamento de estados de deficiência.

É impossível considerar a função da vitamina B_{12} sem considerar o folato

As funções da vitamina B_{12} e do folato estão inter-relacionadas, e a deficiência de qualquer um produz os mesmos sinais e sintomas. A reação que envolve ambas as vitaminas é a reação de metilação, responsável pela conversão da homocisteína em metionina (Fig. 11.8).

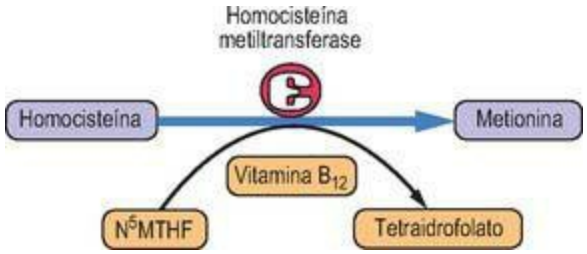


Fig. 11.8 A "armadilha do tetrafolato". A vitamina B_{12} e o folato estão envolvidos na conversão da homocisteína em metionina. A ausência da vitamina B_{12} inibe a reação e leva à formação de N^5-metiltetraidrofolato (N^5MeTHF). Essa ocorrência é conhecida como "armadilha do tetraidrofolato".

A vitamina B_{12} é necessária em apenas uma outra reação, que é a conversão de metilmalonil-CoA em succinil-CoA. A forma de coenzima da vitamina, nesse caso, é a 5′-desoxi adenosilcobalamina. Mecanismos específicos existem para a absorção e o transporte da cobalamina (Fig. 11.9).

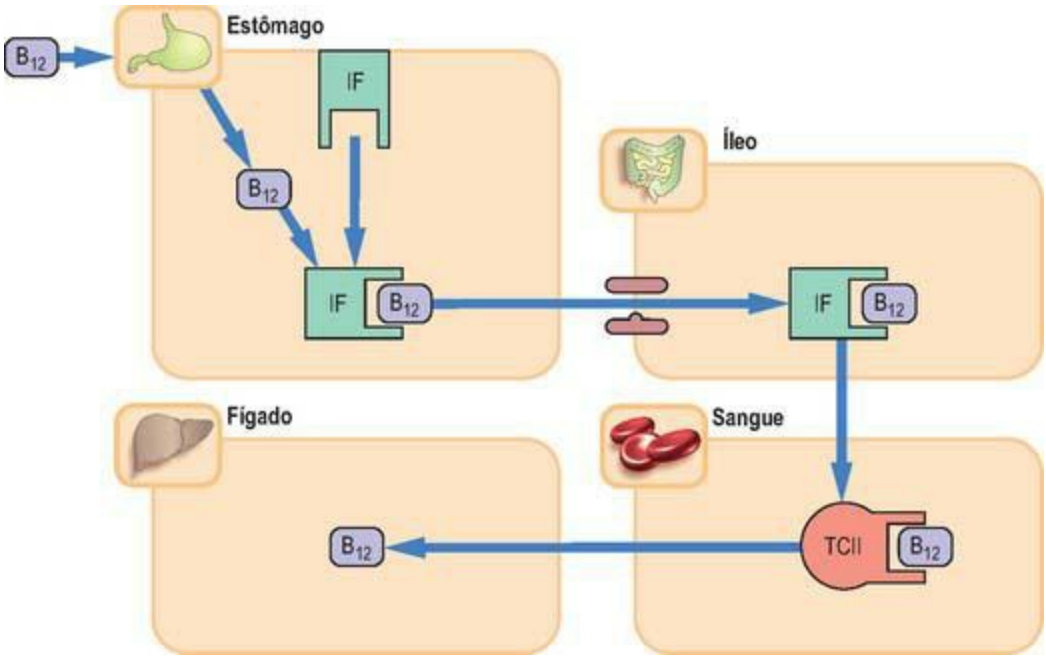


Fig. 11.9 Digestão, absorção e transporte da vitamina B_{12}. A difusão simples da vitamina B_{12} através da membrana intestinal é responsável por 3% do transporte vitamínico, e a ligação com o fator intrínseco (IF) é responsável por 97%. Os derivados da vitamina B_{12} são liberados pelos alimentos a partir da digestão peptídica no estômago e se ligam ao IF que são liberados pelas células parietais da mucosa gástrica. O complexo IF-B_{12} é necessário para a absorção por sítios receptores específicos presentes na mucosa do íleo. O fator limitante da taxa de absorção é o número de sítios receptores presentes no íleo. Outras proteínas de transporte (transcobalamina I, II e III (TC I, II e III) e proteínas R) estão envolvidas no transporte ou armazenamento das cobalaminas. As últimas são liberadas pelas glândulas salivares e pela mucosa gástrica.

A anemia megaloblástica característica da deficiência de vitamina B_{12} é provavelmente consequência de deficiência de folato reduzido e um consequente acúmulo de N^5-metiltetraidrofolato; daí, a síndrome associada ao folato/B_{12}. Um quadro neurológico também pode se desenvolver na ausência de anemia. Isso é conhecido como degeneração combinada subaguda da medula espinal e é provavelmente secundária a uma deficiência de metionina na medula espinal. Uma vez que a vitamina B_{12} é necessária em apenas duas reações, a deficiência dessa vitamina ocasiona o acúmulo de ácido

metilmalônico e homocisteína, com consequente acidúria metilmalônica e homocisteinúria.

A deficiência de vitamina B_{12} causa anemia perniciosa

A deficiência de vitamina B_{12} pode ocorrer através de vários mecanismos. O mais comum é a falta do fator intrínseco (IF, do inglês *intrinsic factor*) no estômago: isso evita a absorção da vitamina no íleo terminal e causa a anemia perniciosa. A carência de fator intrínseco pode ser causada também por cirurgia gástrica. Uma situação similar, ainda que causada por mecanismo diferente, ocorre em função da remoção cirúrgica do íleo, por exemplo na doença de Crohn (Cap. 10). Vegans* apresentam risco de desenvolver deficiência de vitamina B_{12}, uma vez que ela é encontrada apenas em alimentos de origem animal (a dieta vegetal pode conter alguma vitamina apenas se estiver contaminada por microrganismos, como fungos). A vitamina B_{12} é secretada na bile e está presente na circulação êntero-hepática. Distúrbios nessa circulação podem ter graves reflexos sobre os níveis de vitamina B_{12} (Tabela 11.1).

Tabela 11.1 Causas da deficiência de vitamina B_{12}.

Causas da deficiência de vitamina B_{12}	
Mecanismo	**Tempo para desenvolver a deficiência clínica (anos)**
dieta vegetariana	10-12
falha do fetor intrínseco	1-4
disfunção ileal	rapidamente

A vitamina B_{12} deve ser suplementada quando um tratamento com folato for conduzido

É importante mencionar que administrar folato isoladamente em um caso de deficiência de vitamina B_{12} agrava a neuropatia. Dessa forma, se a suplementação for necessária durante a investigação da causa de uma anemia megaloblástica, há necessidade de administrar folato em conjunto com a vitamina B_{12} (após amostras de sangue e de medula óssea terem sido coletadas para confirmar o diagnóstico).

A vitamina C é um agente redutor

A vitamina C, ou ácido ascórbico, é um nutriente essencial para humanos, primatas superiores, porquinhos-da-índia e morcegos frutívoros. Em todos os outros animais, existe uma via específica para sua síntese. A via de síntese e a estrutura da vitamina C são mostradas na Figura 11.10. A vitamina C é lábil: é facilmente destruída por oxigênio, íons metálicos, pH aumentado, calor e luz. A vitamina C serve como agente redutor, e sua forma ativa é o ácido ascórbico, o qual é oxidado durante a transferência dos equivalentes redutores em ácido desidroascórbico (que também pode atuar como fonte da vitamina). A atividade antioxidante da vitamina C é ilustrada na Figura 37.8. A vitamina C participa da síntese de colágeno, adrenalina, esteroides, degradação da tirosina, formação de ácidos biliares, absorção de ferro e metabolismo ósseo. A principal função desse composto é manter cofatores metálicos em seus menores estados de valência, por exemplo, Fe^{+2} e Cu^{+2}. Esse é o caso da síntese do colágeno, onde ele é necessário especificamente para a hidroxilação da prolina (Cap. 28).



Fig. 11.10 Estrutura e síntese da vitamina C (ácido ascórbico). Note que a enzima que converte a gulonolactona em ácido ascórbico está ausente no homem, primatas superiores, porquinho-da-índia e morcegos frutívoros.

A deficiência de vitamina C causa escorbuto e compromete a função imune

A deficiência de vitamina C causa escorbuto devido à síntese defeituosa de colágeno. É caracterizada por hemorragias subcutâneas e outras, fraqueza muscular, gengivas moles, inchadas e sangrentas, osteoporose, dificuldade na cicatrização de ferimentos e anemia. A osteoporose ocorre pela incapacidade de manter a matriz óssea em associação à desmineralização. Este último aspecto acarreta o aparecimento das zonas de Looser nas radiografias, especialmente das mãos.

À exceção dos idosos, a deficiência de vitamina C que acarreta todo o quadro clínico de escorbuto é rara.

Formas mais brandas da deficiência de vitamina C são mais comuns, e os sintomas incluem o aparecimento de hematomas e petéquias (pequenas hemorragias pontuais abaixo da pele) ambas em decorrência da fragilidade capilar. A função imune também fica comprometida. Essa redução na imunidade foi a base do fornecimento de megadosagens de vitamina C para a prevenção do resfriado comum e também pelo seu papel na prevenção do câncer. No entanto, não existem evidências claras para fundamentar essas propostas inicialmente feitas por Linus Pauling durante a década de 1970. A vitamina C é certamente necessária para a função leucocitária normal, e a vitamina C dos leucócitos diminui bastante após estresse causado por trauma ou infecção.

PROTEÍNAS DE TRANSPORTE DA VITAMINA B_{12}

O fator intrínseco (IF) é uma glicoproteína altamente específica. Outras proteínas de ligação à cobalamina, proteínas R e proteínas secretadas pelas glândulas salivares e pelo estômago, também são glicoproteínas que em conjunto com a transcobalamina (TC) I e III, são agora chamadas de cobalafilinas. O terceiro tipo de proteína cobalâmica, também uma glicoproteína, é a TC II. Todas as três classes de proteínas de transporte de B_{12} são glicoproteínas, polipeptídios de uma única cadeia (340-375 resíduos de aminoácidos) e têm um único sítio de ligação com a cobalamina. No entanto, imunologicamente não apresentam reação cruzada entre eles e são codificadas por genes diferentes.

Em pH ácido, as proteínas R se ligam à cobalamina mais fortemente que o IF. Ao contrário do IF, elas são normalmente degradadas pelas proteinases pancreáticas. Dessa forma, na doença pancreática em que as proteínas R não são degradadas, haverá menos cobalamina disponível para se ligar ao IF, causando perda da capacidade de absorção dessa vitamina.

Nos estágios finais do processo absortivo, na presença de Ca^{+2} e em pH neutro, um sítio específico da molécula do fator intrínseco se liga ao receptor presente no íleo. À medida que o complexo IF-B_{12} cruza a mucosa do íleo, o IF é liberado e a B_{12} é transferida para a TC II, uma proteína plasmática de transporte. Outras proteínas de ligação de cobalamina, TC I e possivelmente TC III, existem no plasma e no fígado. No fígado, essas proteínas fornecem excelentes formas de armazenamento da vitamina, uma situação que é única para as vitaminas hidrossolúveis.

Uma vez que a cobalamina se liga a TC II no sangue portal, ela desaparece do plasma dentro de algumas horas. A principal forma circulante é a metilcobalamina. No fígado, a 5′-desoxiadenosil cobalamina representa 70%, e a metilcobalamina, 30% da quantidade total.

O complexo TC II-cobalamina fornece cobalamina exógena aos tecidos, nos quais se liga a receptores da superfície celular. Ele entra na célula por endocitose, liberando a cobalamina na forma de hidroxicobalamina. A conversão de hidroxicobalamina em metilcobalamina ocorre no citosol. A TC II é também considerada necessária para o fornecimento de vitamina B_{12} para o sistema nervoso central.

Frutas cítricas e brotos de vegetais são ricas fontes de vitamina C. Não existe evidência de que a vitamina C em excesso seja tóxica. Teoricamente, como ela é metabolizada em oxalato, existe risco de desenvolvimento de pedras renais de oxalato em indivíduos suscetíveis. No entanto, isso não foi substanciado na prática.

Suplementação vitamínica na dieta

A suplementação de algumas vitaminas fornece benefícios claros para a saúde.

Situações nas quais os benefícios da suplementação vitamínica são claros incluem suplementação de ácido fólico para mulheres grávidas ou que estão planejando engravidar, para dessa forma prevenir má formação do tubo neural; a administração de vitamina D a pessoas que vivem em áreas de pouca luz solar também tem sido benéfica.

Os benefícios da suplementação vitamínica no câncer e na doença cardiovascular são incertos

Como a suplementação de ácido fólico, vitamina B_6 e vitamina B_{12} diminui a concentração plasmática de homocisteína, foi sugerido que essa prática poderia ser benéfica à prevenção de doenças cardiovasculares. Houve também sugestões de que a suplementação de vitamina A, C e E pudesse proteger contra o câncer. Alguns estudos observacionais sugeriram que a suplementação de vitamina C e E poderia ser útil na prevenção de doenças cardiovasculares. No entanto, estudos prospectivos sobre o tema geraram resultados controversos. As recomendações da força-tarefa dos serviços de prevenção dos Estados Unidos publicadas em 2003 (www.preventiveservices.ahrq.gov) dizem que evidências atuais são insuficientes para recomendar o uso ou o não uso de suplementos de vitaminas A, C ou E, multivitamínicos com ácido fólico ou combinações antioxidantes na prevenção do câncer ou de doenças cardiovasculares. Note que essas recomendações não se aplicam às pessoas com carências nutricionais, mulheres grávidas ou lactantes, crianças, idosos e pessoas com doenças crônicas.

Como mencionado anteriormente, suplementação vitamínica em altas doses pode ser perigoso; os exemplos são a redução da densidade mineral óssea, a hepatotoxicidade e a teratogenicidade, associadas a altas doses de vitamina A. A suplementação de β-caroteno para fumantes também foi prejudicial, ocasionando aumento na mortalidade por câncer de pulmão.

Frutas e vegetais são as melhores fontes vitamínicas

Nos estudos clínicos mencionados anteriormente, as vitaminas foram suplementadas em suas formas puras, em vez de fontes alimentares completas, e pode ser por esse motivo que o benefício da suplementação não foi evidente. Evidentemente há benefícios em dietas alimentares ricas em frutas e vegetais, os quais são as fontes mais importantes de vitaminas. Não há razão para desencorajar as pessoas a usarem suplementos vitamínicos, à exceção daquelas situações comprovadas de toxicidade associadas ao excesso de suplementação.

OLIGOELEMENTOS

Íons metálicos são necessários como componentes ativos das proteínas

O mais óbvio desses íons é o ferro, o qual faz parte das proteínas envolvidas na transferência do oxigênio molecular (Cap. 5). Outros metais têm sido considerados essenciais para a função biológica. Eles incluem os metais previamente considerados tóxicos, de fato, o excesso deles no meio ambiente acarreta toxicidade. Tais elementos incluem cromo, selênio, manganês, cobre e zinco, e são chamados de oligoelementos essenciais.

Zinco

O zinco é componente de várias enzimas que participam do metabolismo energético, metabolismo de carboidratos, síntese e degradação de proteínas, funções de transporte celular e proteção contra lesão oxidante. A espermatogênese também é um processo dependente de zinco se levado em consideração o papel desse metal no metabolismo da testosterona. O zinco também tem um papel na manutenção da função pancreática endócrina e exócrina. No entanto, seus efeitos são mais obviamente observados na manutenção da integridade da pele e na recuperação de lesões.

A absorção de zinco da dieta é um processo ativo e compartilha mecanismos de transporte intestinais com o cobre e com o ferro

Na absorção, o zinco está ligado à proteína metalotioneína, uma proteína rica em cisteína, que também está relacionada com a ligação de outros íons metálicos bivalentes como, por exemplo, o cobre. Sua síntese é dependente da quantidade de oligoelementos presente na dieta. O excesso dessa proteína pode interferir na absorção do cobre. O zinco é provavelmente o menos tóxico de todos os oligoelementos metálicos, mas sua ingestão elevada interfere na absorção do cobre, levando à deficiência do último.

A deficiência de zinco afeta o crescimento, a integridade da pele e a cicatrização

A deficiência de zinco não é incomum: em crianças, a deficiência é caracterizada pelo retardo do crescimento, lesões na pele e desenvolvimento sexual alterado. Um defeito hereditário na absorção de zinco pelo intestino foi identificado na década de 1970 e ficou conhecido como acrodermatite êntero-hepática, clinicamente evidenciando lesões graves na pele, diarreia e perda de cabelos (alopecia). A deficiência do zinco também ocasiona alterações no paladar e olfato, além de retardo na cicatrização.

DEFICIÊNCIA DE ZINCO

Um homem de 34 anos de idade que necessitou de uma alimentação completa intravenosa vem recebendo a mesma prescrição por aproximadamente quatro meses, e nenhuma avaliação dos níveis de oligoelementos foi feita. Durantes esse período, ele continuou a exibir perdas gastrointestinais importantes e pirexia intermitente. Inicialmente, ele desenvolveu erupções no rosto, pescoço e cabeça, seguidas de queda de cabelo e, ao final do período de quatro meses, estava claramente com deficiência de zinco. Ele apresentava erupções semelhantes à acne amplamente distribuídas e tinha falta de cabelos. Sua concentração sérica de zinco naquele momento era menor que 1 μmol/L (faixa: 9-20 μmol/L; 60-130 μg/dL).

Comentário: Pacientes com doenças catabólicas e perdas gastrointestinais aumentadas apresentam aumento acentuado nas demandas nutricionais de zinco. O estado de depleção de zinco que esse paciente desenvolveu agravaria sua doença ao prevenir a recuperação das suas lesões gastrointestinais, tornando-o mais suscetível a infecções, devido ao comprometimento de seu sistema imunológico. Pacientes que recebem alimentação intravenosa precisam ter seus níveis de micronutrientes monitorados regularmente.

Perdas aumentadas de zinco ocorrem em pacientes com queimaduras extensas e naqueles com

lesão renal. A perda de zinco na lesão renal é devida à sua associação com a albumina plasmática, e acompanha a perda urinária da proteína. Quantidades significativas de zinco também podem ser perdidas durante a hemodiálise. Um aumento da síntese de metalotioneína é parte da resposta metabólica ao trauma e ocasiona a redução da concentração sérica de zinco. Durante a alimentação intravenosa, em situação nas quais há frequentemente maior demanda de zinco, a falha em repô-lo pode produzir deficiência sintomática.

A medida da concentração do zinco sérico é o método usual para avaliar os níveis de zinco. No entanto, várias condições e fatores ambientais afetam sua concentração plasmática, incluindo inflamação, estresse, câncer, tabagismo, administração de esteroides e hemólise.

Cobre

O cobre metaboliza o superóxido e outras espécies reativas do oxigênio

O cobre está associado a várias enzimas oxigenases, incluindo a citocromo oxidase e a superóxido dismutase (a última também necessita de zinco para sua atividade). Uma das principais atividades do cobre, especialmente na superóxido dismutase, mas também em associação com a proteína carreadora de cobre ceruloplasmina, é a metabolização do superóxido e de outras espécies reativas do oxigênio. O cobre também é necessário para fazer as ligações cruzadas entre moléculas de colágeno, sendo um componente essencial da lisil oxidase. O único mecanismo de excreção do cobre é através da bile.

A absorção do cobre pelo intestino ocorre da mesma forma que a do zinco, associada à metalotioneína. O nível de cobre no organismo depende menos da alimentação que o nível do zinco, embora a alta ingestão de fibras diminua sua disponibilidade por se ligar a esse metal.

No plasma, o cobre absorvido é ligado à albumina. O complexo cobre-albumina é rapidamente captado pelo fígado. Dentro do hepatócito, o cobre se associa com metalotioneínas intracelulares, que também são capazes de se ligar ao zinco e ao cádmio. O cobre é transportado dentro do hepatócito para locais de síntese proteica por uma proteína chaperonina e é incorporado à apoceruloplasmina. Essa incorporação é catalisada por uma ATPase chamada ATP7B. A ceruloplasmina é liberada na circulação.

O excesso de cobre causa cirrose hepática

Quando ingerido oralmente, o cobre normalmente não é tóxico, porém em altas doses ele se acumula nos tecidos. A ingestão excessiva crônica, ocasiona cirrose hepática. A toxicidade aguda é manifestada por relevante hemólise e danos ao fígado e aos neurônios. A última é observada na doença de Wilson, um distúrbio metabólico autossômico dominante, no qual a capacidade hepática de síntese da ceruloplasmina está comprometida. A causa está nas mutações do gene que codifica a ATPase ATP7B. Isso ocasiona uma redução na incorporação do cobre à ceruloplasmina e, posteriormente, acúmulo celular. O excesso de apoceruloplasmina é degradado. O cobre, além de se acumular nos tecidos, também se acumula no cérebro e na córnea. Os sintomas desse acúmulo são deficiências neurológicas, cirrose hepática e presença típica de anéis de Kaiser-Fleisher na córnea. Caracteristicamente, há também baixa concentração de ceruloplasmina e alta excreção urinária de cobre (Quadro na pág 92).

A deficiência de cobre é rara

A deficiência de cobre é rara e causa anemia; a pele e os cabelos podem também ser afetados. A deficiência de cobre é mais comum de ocorrer em função da ingestão reduzida ou da perda excessiva de cobre, por exemplo, durante a diálise renal. A deficiência se manifesta como anemia microcítica hipocrômica (caracterizada por eritrócitos pálidos) que é resistente ao tratamento com ferro. Há também uma redução no número de leucócitos sanguíneos (neutropenia) e degeneração do tecido vascular seguido de sangramento devido aos problemas na síntese de elastina e colágeno. Em deficiências graves, a despigmentação da pele e a alteração da estrutura do cabelo também podem ocorrer.

Selênio

O selênio está presente em todas as células na forma dos aminoácidos selenometionina e selenocisteína

O selênio forma uma parte da enzima antioxidante glutationa peroxidade. Também é imprescindível para a iodotironina 5-deiodinase tipo I, a qual participa da deiodinação hepática da tiroxina; em animais, o selênio é um componente das proteínas musculares selenoproteína P e selenoproteína W. O selênio é absorvido pelo intestino delgado, carreado por proteínas na circulação e excretado pela urina.

O selênio está presente na dieta como selenometionina e selenocisteína. Sua concentração nos vegetais vai depender do conteúdo do solo. Suas fontes dietéticas incluem vísceras de animais, peixe (atum), mariscos e cereais.

O aumento na ingestão de selênio pode ser necessário durante a lactação. Existe uma rara cardiomiopatia (doença de Keshan) que se desenvolve na falta de selênio, que é endêmica na China, em áreas de ingestão muito baixa de selênio. A deficiência de selênio pode também se desenvolver durante a nutrição parenteral total e ocasionar dor muscular crônica, leitos subungueais anormais e cardiomiopatia. O excesso de selênio leva a cirrose hepática, esplenomegalia, sangramento gastrointestinal e depressão.

Outros metais

Vários outros oligoelementos são necessários para uma função biológica normal, por exemplo, o manganês, o níquel e o cádmio. O último é provavelmente mais conhecido por seus efeitos tóxicos sobre os rins, e tem sido especialmente observado em trabalhadores portuários expostos a esse metal por longos períodos. À medida que as técnicas de separação e análise desenvolvem-se, outros metais e outras funções de minerais essenciais serão conhecidas. Isso levará a uma melhor compreensão da epidemiologia de certas doenças, as quais podem ter, pelo menos em parte, uma etiologia ambiental.

Resumo

- As vitaminas funcionam principalmente como cofatores enzimáticos.

- Vitaminas lipossolúveis podem ser armazenadas no tecido adiposo, enquanto as hidrossolúveis possuem apenas uma pequena reserva, e seu armazenamento é inexistente ou a curto prazo.

- As deficiências de micronutrientes da dieta ocorrem com maior frequência em grupos suscetíveis, com demanda aumentada ou em pessoas incapazes de manter ingestão adequada. Crianças, grávidas, idosos e grupos de baixa renda são particularmente vulneráveis.

- As doenças gastrointestinais, bem como cirurgia gastrointestinal, são causas potenciais de deficiências de micronutrientes.

- As vitaminas e os oligoelementos são particularmente importantes em pacientes submetidos a dietas especiais ou a nutrição parenteral.

- Enquanto existirem controvérsias sobre suplementação de algumas vitaminas, a ingestão de frutas e vegetais como fontes vitamínicas é certamente recomendada.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Compare e contraste as deficiências de vitamina B_{12} e ácido fólico.

2. Quando o aumento da ingestão de determinado nutriente ou energia pode precipitar uma deficiência vitamínica?

3. A suplementação de vitamina A é segura?

4. Descreva a importância clínica do cobre.

5. Quais vitaminas têm papel no desenvolvimento de hiperomocisteinemia?

Leituras sugeridas

Asplund K. Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *J Int Med*. 2002;251:372-392.

El-Youssef M. Wilson disease. *Mayo Clin Proc*. 2003;78:1126-1136.

Fairfield KM, Fletcher RH. Vitamins for chronic disease prevention in adults: scientific review. *JAMA*. 2002;287:3116-3126.

Ferenci P. Diagnosis and current therapy of Wilson's disease. *Aliment Pharmacol Therapeut*. 2004;19:157-165.

Fletcher RH, Fairfield KM. Vitamins for chronic disease prevention in adults: clinical applications. *JAMA*. 2002;287:3127-3129.

Jones G. Eating fruit and vegetables. *BMJ*. 2003;326:888.

Lucock M. Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? *BMJ*. 2004;328:211-214.

Panel on Dietary Reference Values of the Committee on Medical Aspects of Food Policy. Dietary reference values for food energy and nutrients for the United Kingdom. London: TSO, 2003.

Sites

National Guideline Clearinghouse. www.guideline.gov.

Força-tarefa dos serviços de proteção dos Estados Unidos (US Preventive Services Task Force). www.preventiveservices.ahrq.gov.

[*] Nota da Tradução: Essa afirmação sobre a epidemiologia da pelagra é potencialmente controversa, sobretudo quando se considera que tal doença pode ocorrer por outros mecanismos fisiopatológicos além dos dietéticos.

[*] Nota da Tradução: Vegetarianos que não consomem nenhum produto de origem animal (ovos, leite, mel ou qualquer outro).

Metabolismo Anaeróbico da Glicose nos Eritrócitos

J.W. Baynes

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a sequência de reações da glicólise anaeróbica, a via central do metabolismo de carboidratos em todas as células.

- Resumir a energética da glicólise anaeróbica, incluindo as reações envolvidas na utilização e na formação do ATP e o rendimento líquido de ATP durante a glicólise.

- Identificar o sítio primário da regulação alostérica da glicólise e o mecanismo de regulação desta enzima.

- Identificar os passos na glicólise que demonstram o uso de reações acopladas para permitir processos termodinamicamente desfavoráveis, incluindo a fosforilação em nível de substrato.

- Descrever os principais papéis da via das pentoses fosfato nos eritrócitos e nas células nucleadas.

- Descrever o papel da glicólise anaeróbica no desenvolvimento de cáries dentárias.

- Explicar por que a glicólise é essencial para as funções normais das células vermelhas, incluindo as consequências das deficiências em enzimas glicolíticas e o papel da glicólise na adaptação a grandes altitudes.

- Explicar a origem da anemia hemolítica induzida por drogas em pessoas com deficiência de G6PD.

INTRODUÇÃO

A glicose é o principal carboidrato na Terra, o esqueleto e a unidade monomérica da celulose e do amido. É também o único combustível utilizado por todas as células do nosso corpo. Todas essas células, até mesmo os micróbios que estão no nosso intestino, iniciam o metabolismo da glicose por uma via denominada glicólise, ou seja, quebra (lise) de carboidrato (glico). A glicólise é catalisada por enzimas citosólicas solúveis e é a via metabólica central e ubíqua do metabolismo da glicose. O eritrócito, comumente conhecido como célula vermelha sanguínea (CVS), é singular entre todas as células do corpo — ele utiliza a glicose e a glicólise como sua única fonte de energia. Assim, o eritrócito é um modelo útil para uma introdução à glicólise.

O piruvato, um ácido carboxílico de três carbonos, é o produto final da glicólise; dois moles de piruvato são formados por mol de glicose. Em células que têm mitocôndria e metabolismo oxidativo, o piruvato é convertido completamente em CO_2 e H_2O — a glicólise nesse caso é denominada glicólise aeróbica. Nos eritrócitos, que não possuem mitocôndria e não realizam o metabolismo oxidativo, o piruvato é reduzido a ácido lático, um hidroxiácido de três carbonos, o produto da glicólise anaeróbica. Cada mol de glicose rende dois moles de lactato, os quais são excretados para o sangue. Duas moléculas de ácido lático contêm exatamente o mesmo número de carbonos, hidrogênios e oxigênios do que uma molécula de glicose (Fig. 12.1); entretanto, há energia livre disponível a partir da clivagem e rearranjo da molécula de glicose suficiente para produzir dois moles de ATP por mol de glicose convertida a lactato. O eritrócito utiliza a maior parte do seu ATP para manter os gradientes eletroquímicos e iônicos através da sua membrana plasmática.

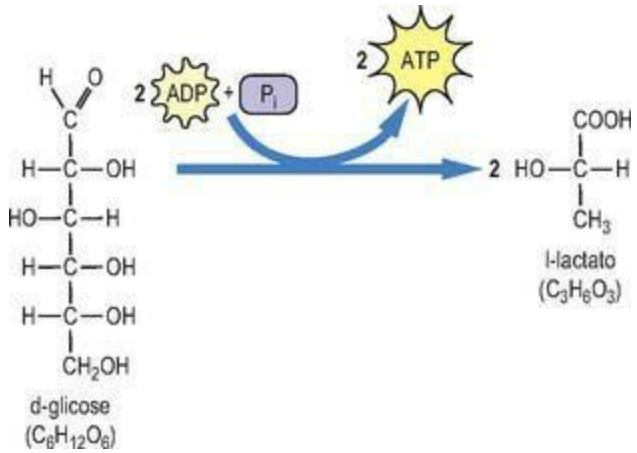


Fig. 12.1 Conversão da glicose a lactato durante a glicólise anaeróbica. Um mol de glicose é convertido a dois moles de lactato durante a glicólise anaeróbica. Não há consumo de oxigênio nem há produção de CO_2 nessa via. Há um saldo de dois moles de ATP por mol de glicose convertido a lactato.

Na célula vermelha, 10%-20% do intermediário glicolítico 1,3-bisfosfoglicerato são desviados para a síntese de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG), um regulador alostérico da afinidade da hemoglobina pelo O_2. A via das pentoses fosfato, que leva a um desvio da glicólise, representa cerca de 10% do metabolismo da glicose no eritrócito. No eritrócito, essa via tem um papel especial na proteção contra o estresse oxidativo, enquanto em células nucleadas ela também serve como fonte de

NADPH para reações biossintéticas e de pentoses para a síntese de ácidos nucleicos.

O ERITRÓCITO

O eritrócito, ou célula vermelha sanguínea (CVS), representa 40%-45% do volume sanguíneo e mais de 90% dos elementos figurados do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas). O eritrócito é, tanto estrutural quanto metabolicamente, a célula mais simples do corpo — o produto final da maturação dos reticulócitos da medula óssea. Durante sua maturação, a CVS perde todas as suas organelas subcelulares. A ausência do núcleo impossibilita a síntese de DNA e RNA. Sem ribossomos e retículo endoplasmático, ela não pode sintetizar ou secretar proteínas. Por não poder oxidar gorduras, um processo que requer atividade mitocondrial, o eritrócito conta exclusivamente com a glicose sanguínea como combustível. O metabolismo da glicose nos eritrócitos é inteiramente anaeróbico, sendo compatível com o papel primário dos eritrócitos no transporte e liberação de oxigênio, preferencialmente à sua utilização.

GLICÓLISE

Visão geral

A glicose entra no eritrócito por difusão facilitada, através do transportador de glicose independente de insulina, o GLUT-1. A concentração de glicose no eritrócito não é significativamente diferente daquela do plasma. Desse modo, as dosagens clínicas laboratoriais da concentração de glicose no plasma, no soro e no sangue total são essencialmente idênticas.

A glicólise progride através de uma série de intermediários fosforilados, iniciando pela síntese de glicose-6-fosfato (Glc-6-P). Durante esse processo, o qual envolve dez etapas catalisadas por enzimas, duas moléculas de ATP são gastas (estágio de *investimento*) para produzir um intermediário aproximadamente simétrico, a frutose-1,6-bisfosfato (Fru-1,6-BP), a qual é depois clivada (estágio de *divisão*) a duas trioses fosfato de três carbonos. Estes são eventualmente convertidos a lactato, com produção de ATP, durante o estágio de *rendimento* da glicólise. O estágio de rendimento inclui tanto reações redox quanto de fosforilação, levando à formação de quatro moléculas de ATP durante a conversão de duas trioses fosfato a lactato. A consequência é um saldo de dois moles de ATP por mol de glicose convertido a lactato.

A glicólise é uma via relativamente ineficiente para extrair energia a partir de glicose: o saldo de dois moles de ATP por mol de glicose é de apenas cerca de 5% dos 36-37 ATPs disponíveis após a completa oxidação de glicose a CO_2 e H_2O pela mitocôndria em outros tecidos.

Você deve estar se perguntando por que uma via de 10 passos é necessária para converter glicose a lactato; isso não poderia ser feito com menos etapas ou pela clivagem de um carbono por vez? A resposta, sob um ponto de vista metabólico, é que a glicólise não é uma via isolada; a maioria dos intermediários glicolíticos serve como pontos de ramificação para outras vias metabólicas. Desse modo, o metabolismo da glicose intercepta o metabolismo das gorduras, proteínas e ácidos nucleicos, assim como outras vias de metabolismo de carboidratos. Algumas dessas interações metabólicas estão ilustradas na Figura 12.2.

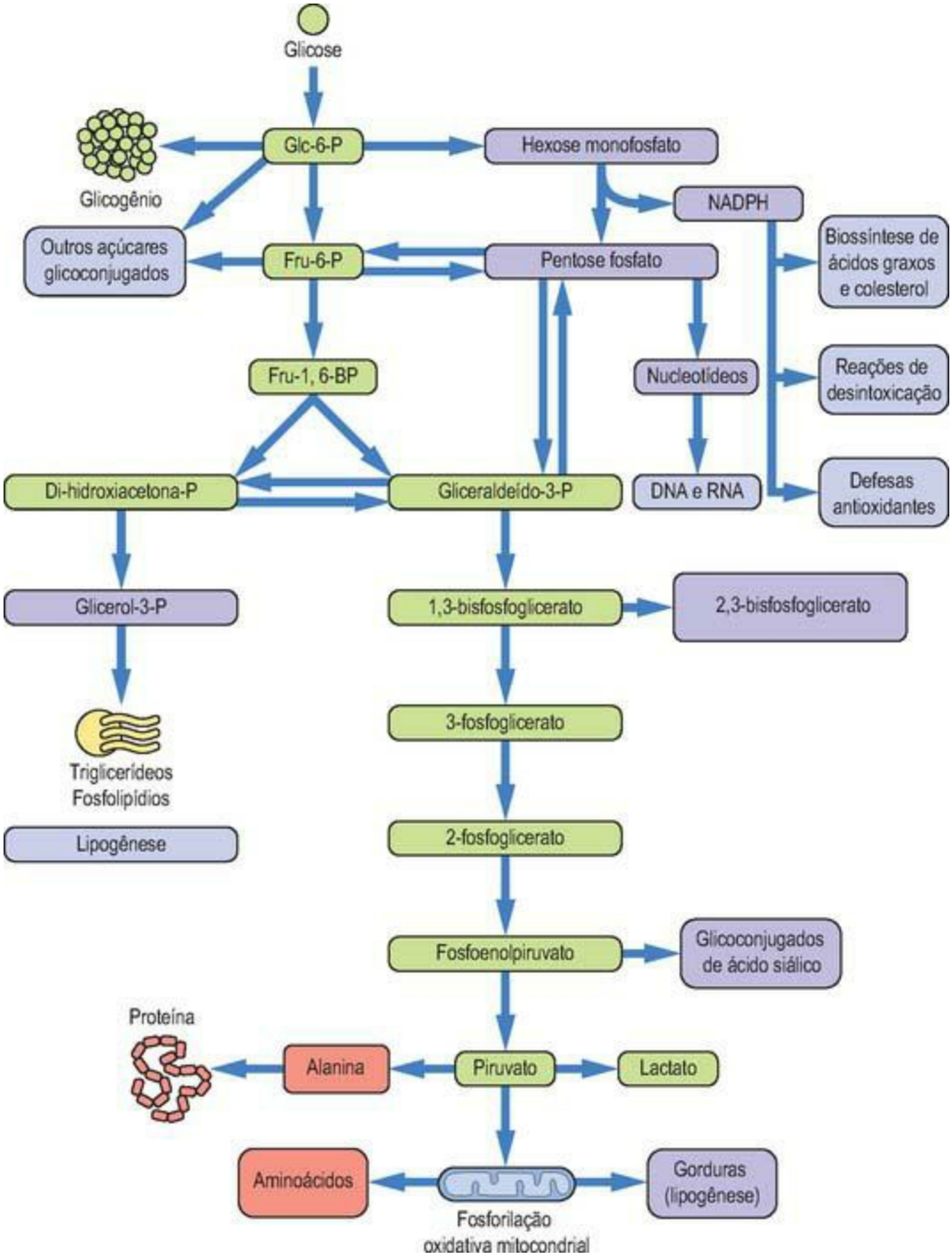


Fig. 12.2 Interações entre a glicólise e outras vias metabólicas. Os quadros em verde indicam os intermediários envolvidos na via da glicólise. Os outros quadros ilustram algumas das interações metabólicas entre a glicólise e outras vias metabólicas na célula. Nem todas essas vias são ativas na célula vermelha, a qual tem capacidade biossintética limitada e ausência de mitocôndria. Glc-6-P, glicose-6-fosfato; Fru-6-P, frutose-6-fosfato; Fru-1,6-BP, frutose-1,6-bisfosfato.

O estágio de investimento da glicólise

Glicose-6-fosfato

A glicose é captada pela célula vermelha por transporte facilitado via GLUT-1 (Cap. 8); essa proteína representa aproximadamente 5% do total de proteínas de membrana da célula vermelha, de forma que o transporte de glicose não é um fator limitante para a glicólise. O primeiro passo no comprometimento da glicose com a glicólise é a fosforilação da glicose a Glc-6-P, catalisada pela enzima hexocinase (Fig. 12.3, topo). A formação de Glc-6-P a partir de glicose livre e fosfato inorgânico é energeticamente desfavorável, então uma molécula de ATP deve ser consumida ou *investida* na reação de fosforilação: a hidrólise do ATP é acoplada à síntese de Glc-6-P. A Glc-6-P fica presa no eritrócito, junto com outros intermediários fosforilados da glicólise, pois não existem sistemas de transportadores para açúcares fosfatados nas membranas plasmáticas das células de mamíferos.

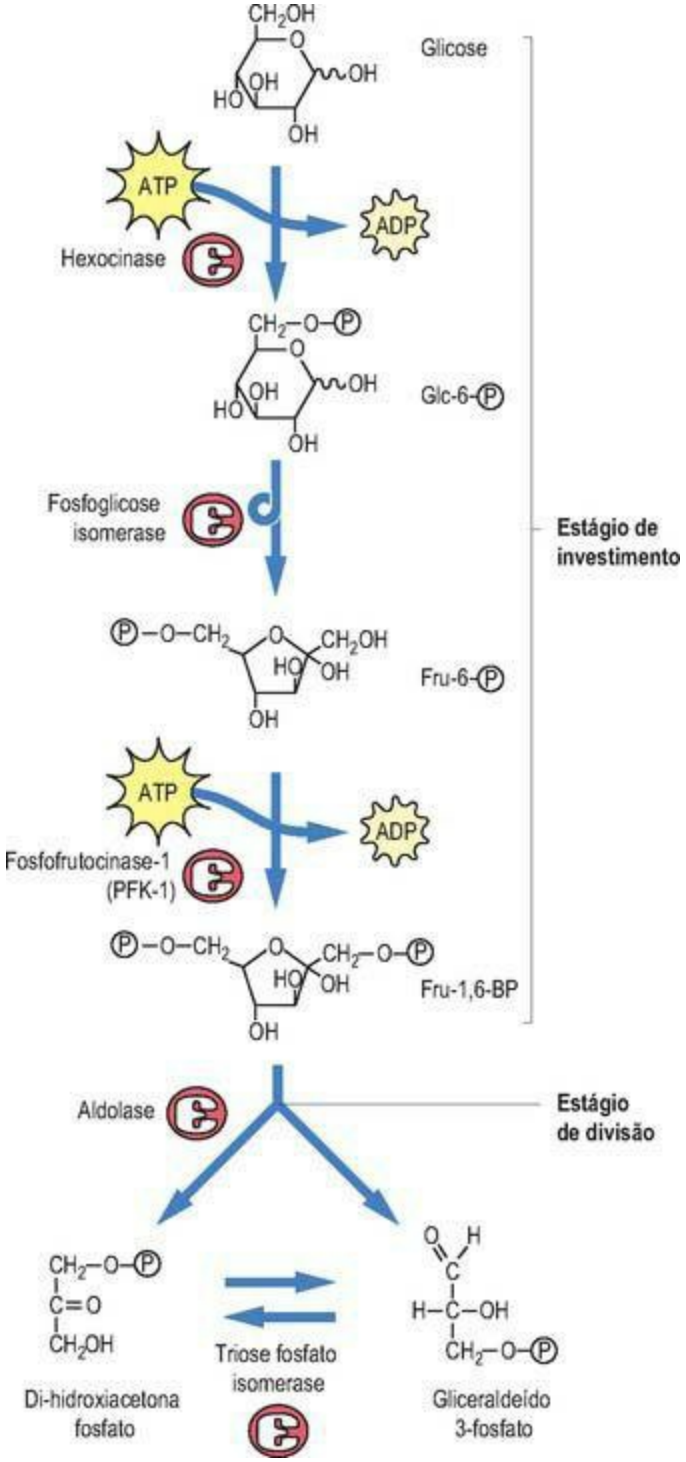


Fig. 12.3 Os estágios de investimento e divisão da glicólise. Observe o consumo de ATP nas reaçÕes da hexocinase e fosfofrutocinase-1.

Frutose-6-fosfato

A segunda etapa da glicólise é a conversão de Glc-6-P a Fru-6-P por uma fosfoglicose isomerase (Fig. 12.3, meio). As isomerases catalisam reações de equilíbrio livremente reversíveis, nesse caso uma interconversão aldose-cetose. A Fru-6-P é então fosforilada no C-1 pela fosfofrutocinase-1 (PFK-1) para gerar um intermediário pseudossimétrico, a frutose 1,6-bisfosfato (Fru-1,6-BP), a qual possui um fosfoéster em cada extremidade da molécula. Tal qual a hexocinase, a PFK-1 requer ATP como substrato e catalisa uma reação essencialmente irreversível (K_{eq} ˜500). Tanto a hexocinase

quanto a PFK-1 são enzimas regulatórias importantes na glicólise, mas a PFK-1 é a etapa crítica que compromete a via. Essa reação direciona a glicose para a glicólise, a única via para o metabolismo da Fru-1,6-BP.

UTILIZAÇÃO DA GLICOSE NAS CÉLULAS VERMELHAS

Em uma pessoa de 70 quilos, existem cerca de cinco litros de sangue e pouco mais de 2 kg (2 L) de células vermelhas. Essas células constituem cerca de 3% do total da massa corporal e consomem cerca de 20 g (0,1 mol) de glicose por dia, representando aproximadamente 10% do metabolismo total de glicose no corpo. As células vermelhas possuem a maior taxa específica de utilização de glicose do que qualquer célula do corpo, aproximadamente 10 g de glicose/kg de tecido/dia, comparado com ˜2,5 g de glicose/kg de tecido/dia para o corpo inteiro.

Na CVS, cerca de 90% da glicose é metabolizada através da glicólise, gerando lactato, o qual é excretado para o sangue. Apesar da sua alta taxa de consumo de glicose, a CVS tem uma taxa de síntese de ATP mais baixa do que qualquer outra célula do corpo, ˜0,1 mol de ATP/kg de tecido/dia, refletindo o fato de que a glicólise anaeróbica restaura somente uma fração da energia disponível da combustão completa da glicose a CO_2 e H_2O.

O estágio de divisão da glicólise

No estágio de divisão da glicólise, a Fru-1,6-BP é clivada ao meio por uma reação aldol-reversa (Fig. 12.3, inferior), por isso a denominação aldolase. A reação da aldolase é uma reação de equilíbrio livremente reversível, gerando duas trioses fosfato, di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, a partir do início e da metade final da molécula de Fru-1,6-BP, respectivamente. Somente o gliceraldeído-3-fosfato continua através do estágio de rendimento da glicólise, mas a triose fosfato isomerase catalisa a interconversão de di-hidroxiacetona fosfato a gliceraldeído-3-fosfato; assim, ambas as metades da molécula de glicose são eventualmente metabolizadas a lactato.

O estágio de rendimento da glicólise — síntese de ATP por fosforilação em nível de substrato

O estágio de rendimento da glicólise produz quatro moles de ATP, rendendo um saldo de dois moles de ATP por mol de glicose convertida a lactato (Fig. 12.4). A síntese de ATP é realizada por cinases que catalisam a *fosforilação em nível de substrato*, processo no qual um composto fosfatado de alta energia transfere seu fosfato para o ADP, gerando ATP.

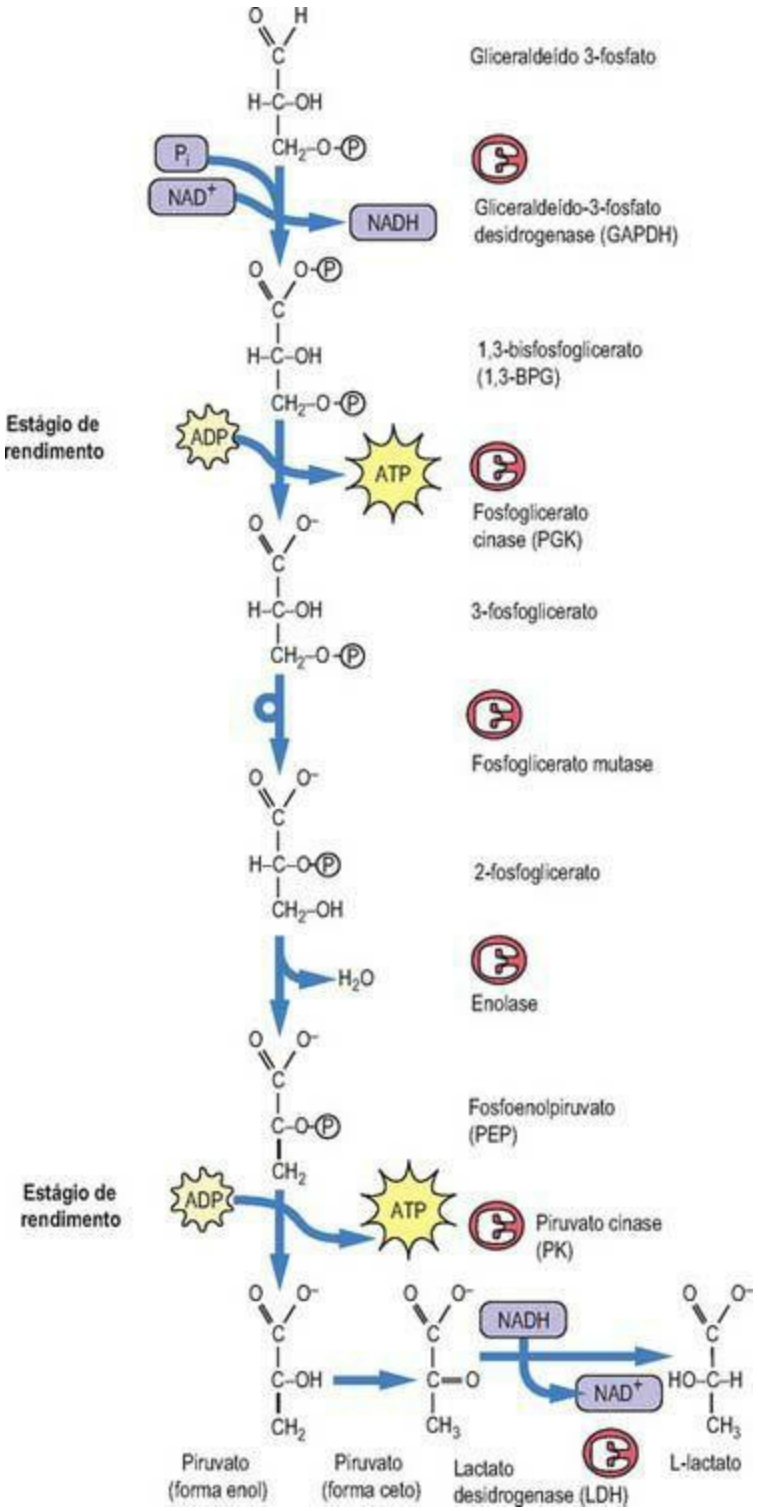


Fig. 12.4 O estágio de rendimento da glicólise. As reações de fosforilação em nível de substrato catalisadas pela fosfoglicerato cinase e piruvato cinase produzem ATP, utilizando compostos de alta energia, 1,3-bisfosfoglicerato e fosfoenolpiruvato, respectivamente. Observe que o NADH produzido durante a reação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é convertido de volta a NAD^+ durante a reação da lactato desidrogenase, permitindo a continuação da glicólise na presença de quantidades somente catalíticas de NAD^+.

Fosforilação em nível de substrato: X˜P + ADP → X + ATP

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Para atingir o estágio para a fosforilação em nível de substrato, o grupamento aldeído do gliceraldeído-3-fosfato é oxidado a ácido carboxílico e a energia disponível dessa reação de oxidação é utilizada, em parte, para capturar um fosfato do meio citoplasmático como um acilfosfato. Essa reação é catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), gerando um composto de alta energia (X˜P), o 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG). A coenzima NAD^+ é simultaneamente reduzida a NADH (Figs. 12.4 e 12.5).

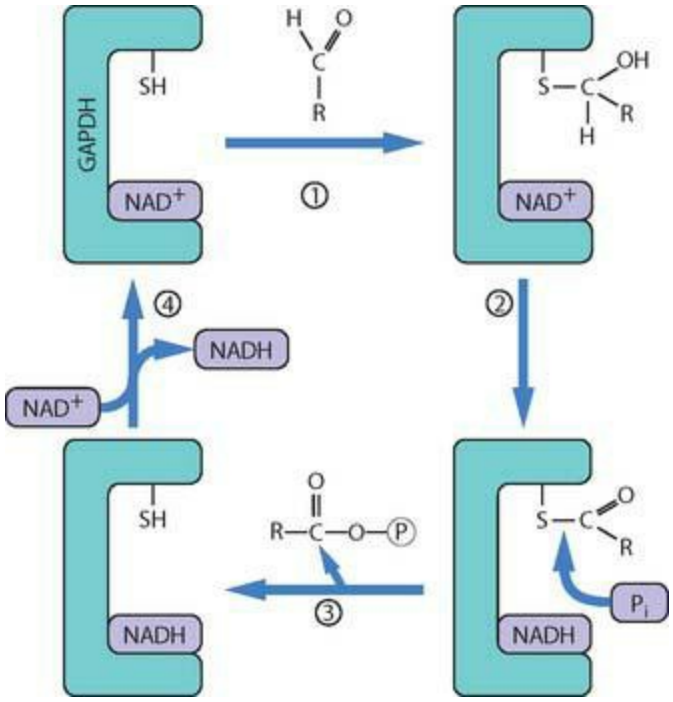


Fig. 12.5 Mecanismo da reação da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH). Na etapa 1, o grupo carbonila do gliceraldeído-3-fosfato forma um aduto tioemiacetal com um resíduo de cisteína do sítio ativo da GAPDH. Na etapa 2, o tioemiacetal é oxidado a um tioéster pelo NAD^+, também ligado ao sítio ativo da enzima. Na etapa 3, o fosfato entra no sítio ativo e, em uma reação de fosforilase, cliva a ligação entre o carbono e o enxofre, deslocando o grupamento 3-fosfoglicerato, produzindo 1,3-bisfosfoglicerato e regenerando o grupamento sulfidrila. Na etapa 4, a enzima substitui o NADH pelo NAD^+, completando o ciclo catalítico.

A reação da GAPDH proporciona uma explicação interessante do papel dos intermediários ligados às enzimas na formação de fosfatos de alta energia. Como a oxidação de um aldeído e a redução de um NAD^+ leva à formação de uma ligação acilfosfato no 1,3-BPG? Como o fosfato entra na molécula e se torna ativado a um estado de alta energia? A inibição da GAPDH pelos reagentes tios, tais como iodoacetamida, *p*-cloromercuriobenzoato e *N*-etilmaleimida, apontaram a participação de um resíduo sulfidrila no sítio ativo da enzima. O mecanismo de ação dessa enzima é descrito na Figura 12.5.

Fosforilação em nível de substrato

A fosfoglicerato cinase (PGK) catalisa a transferência do grupamento fosfato de alta energia acilfosfato do 1,3-BPG para o ADP, formando ATP. Essa reação de fosforilação em nível de substrato rende o primeiro ATP produzido na glicólise. O grupamento fosfato remanescente no 3-fosfoglicerato é um éster fosfato e não tem energia suficiente para fosforilar o ADP, então uma série de reações de isomerização e desidratação é necessária para converter o fosfoéster a um fosfoenol de alta energia. A primeira etapa é deslocar o fosfato para o C-2 do glicerato, convertendo 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato, reação catalisada pela enzima fosfoglicerato mutase (Fig. 12.4). As mutases catalisam a transferência de grupamentos funcionais dentro de uma mesma molécula. A fosfoglicerato mutase tem um resíduo de histidina no sítio ativo e um aduto de fosfo-histidina é formado como um intermediário ligado à enzima durante a reação de transferência do fosfato.

O 2-fosfoglicerato sofre então uma reação de desidratação catalisada pela enolase, uma hidratase, que rende um composto fosfatado de alta energia, o fosfoenolpiruvato (PEP). O PEP é o substrato da piruvato cinase para fosforilar um ADP, gerando piruvato e o segundo ATP, novamente através da fosforilação em nível de substrato. Parece estranho que a ligação do fosfato de alta energia no PEP possa ser formada a partir de um composto fosfatado de baixa energia, o 2-fosfoglicerato, por uma simples sequência de reações de isomerização e desidratação. Entretanto, a força motriz termodinâmica para essas reações é derivada provavelmente da repulsão das cargas entre o fosfato e os grupamentos carboxilados do 2-fosfoglicerato, e a isomerização do enolpiruvato a piruvato seguinte à reação de fosforilação.

A fosfoglicerato cinase e a piruvato cinase catalisam a fosforilação em nível de substrato, reações que geram ATP na glicólise, rendendo dois moles de ATP por mol de triose fosfato ou um total de quatro moles por mol de Fru-1,6-BP. Após o ajuste para o ATP investido nas reações da hexocinase e da PFK-1, o saldo líquido final é de 2 moles de ATP por mol de glicose convertido a piruvato.

Lactato desidrogenase (LDH)

Duas moléculas de piruvato possuem exatamente o mesmo número de carbonos e oxigênios do que uma molécula de glicose, entretanto há um déficit de quatro hidrogênios — cada piruvato tem quatro hidrogênios, um total de oito hidrogênios para dois piruvatos, comparado com 12 em uma molécula de glicose. A "perda" desses quatro hidrogênios aparece na forma de 2 NADH e 2 H^+ formados na reação da GAPDH. Já que o NAD^+ está presente somente em quantidades catalíticas dentro da célula e é um cofator essencial para a glicólise (e outras reações), deve haver um mecanismo para a regeneração de NAD^+ para que a glicólise continue.

A oxidação do NADH é realizada sob condições anaeróbicas pela lactato desidrogenase (LDH), enzima que catalisa a redução do piruvato a lactato pelo NADH + H^+, regenerando o NAD^+. Em mamíferos, todas as células possuem a LDH, e o lactato é o produto final da glicólise sob condições anaeróbicas. Sob condições aeróbicas, a mitocôndria oxida o NADH a NAD^+ e converte o piruvato a CO_2 e H_2O, assim o lactato não é formado. Apesar de possuir capacidade de realizar o metabolismo oxidativo, algumas células podem às vezes se tornar "glicolíticas" formando lactato, por exemplo, no músculo durante um débito de oxigênio, em fagócitos existentes no pus ou em tecidos

pobremente irrigados. A maior parte do lactato excretado para o sangue é recuperada pelo fígado para ser usado como substrato para a gliconeogênese (Cap. 13).

Fermentação

A fermentação é um termo geral para o metabolismo anaeróbico da glicose, normalmente aplicado a organismos unicelulares. Algumas bactérias anaeróbicas, como os lactobacilos, produzem lactato, enquanto outras possuem vias alternativas para a oxidação anaeróbica do NADH formado durante a glicólise. Durante a fermentação em leveduras, a via glicolítica é idêntica à das CVS, exceto pela conversão do piruvato a etanol (Fig. 12.6). O piruvato é primeiramente descarboxilado pela piruvato descarboxilase a acetaldeído, liberando CO_2. O NADH produzido na reação da GAPDH é então reoxidado pela álcool desidrogenase, regenerando o NAD^+ e produzindo etanol. O etanol é um composto tóxico, e as leveduras morrem quando a concentração de etanol no meio atinge cerca de 12%, a concentração aproximada de álcool em vinhos naturais.

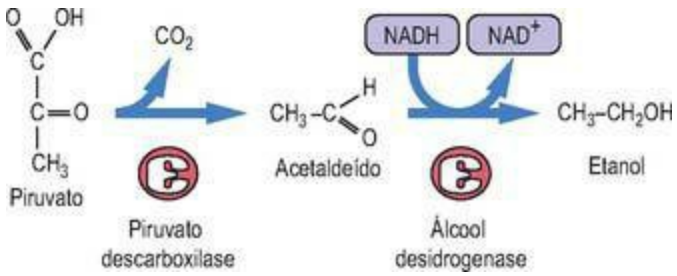


Fig. 12.6 Glicólise anaeróbica em leveduras. Formação do etanol pela glicólise anaeróbica durante a fermentação. O piruvato é descarboxilado pela piruvato descarboxilase, produzindo acetaldeído e CO_2. A álcool desidrogenase usa o NADH para reduzir o acetaldeído a etanol, regenerando o NAD^+ para a glicólise.

INIBIÇÃO DA FOSFORILAÇÃO EM NÍVEL DE SUBSTRATO PELO ARSENATO

O arsênico se encontra logo abaixo do fósforo na Tabela Periódica dos Elementos, e já deveria ser esperado que compartilhe algumas propriedades e reatividades do fosfato. Na verdade, o arsenato tem valores de pK_a similares aos do fosfato e pode efetivamente ser utilizado pela GAPDH, produzindo 1-arsenato-3-fosfoglicerato. Entretanto, a ligação acil-arsenato é instável e rapidamente hidrolisada e, assim, não gera ATP por fosforilação em nível de substrato. Embora o arsenato não iniba qualquer uma das enzimas da glicólise, ele dissipa a energia redox disponível a partir da reação da GAPDH e impede a formação de ATP por fosforilação em nível de substrato na reação da PKG. Na verdade, o arsenato *desacopla* as reações da GAPDH e da PGK. Observe que o arsênico e o arsenito também são tóxicos, mas possuem mecanismo de ação diferente: eles reagem irreversivelmente com grupamentos tiol em enzimas com sulfidrila, tais como GAPDH (Fig. 12.5), inibindo sua atividade irreversivelmente.

INIBIÇÃO DA ENOLASE PELO FLUORETO

As dosagens de concentração da glicose sanguínea são usadas no diagnóstico e no

acompanhamento do diabetes. Frequentemente, essas dosagens são realizadas em laboratório clínico mais de uma hora após a coleta da amostra de sangue. Já que as células vermelhas são capazes de metabolizar a glicose a lactato, mesmo em recipientes selados e anóxicos, a glicose no sangue será consumida e o lactato será produzido, o que leva à acidificação da amostra sanguínea. Essas reações ocorrem nas CVS, mesmo em temperatura ambiente, de modo que a concentração de glicose e o pH diminuem durante a espera da amostra, possivelmente levando a um falso diagnóstico de hipoglicemia e acidemia. O metabolismo anaeróbico da glicose pode ser impedido pela adição de um inibidor da glicólise no tubo de coleta da amostra de sangue. Reagentes sulfidrila podem agir, já que são inibidores da GAPDH; entretanto, a maior parte das amostras de sangue é coletada com pequena quantidade de um reagente muito barato, o fluoreto de sódio, no tubo de coleta da amostra. O fluoreto é um forte inibidor competitivo da enolase, bloqueando a glicólise e a produção de lactato na CVS. É um inibidor competitivo incomum, já que o fluoreto apresenta pouca semelhança com o 2-fosfoglicerato. Nesse caso, o fluoreto forma um complexo com o fosfato e o Mg^{2+} no sítio ativo da enzima, bloqueando o acesso do substrato.

GLICÓLISE E CÁRIES DENTÁRIAS

Streptococcus mutans e *lactobacillus* são bactérias anaeróbicas que colonizam a cavidade oral e contribuem para o desenvolvimento de cáries dentárias. Essas bactérias crescem otimamente em carboidratos refinados e fermentáveis da dieta e excretam ácidos orgânicos, tais como o lactato. Elas se desenvolvem em microambientes acidificados e anaeróbicos de fissuras nos dentes e nas bolsas gengivais. Os ácidos orgânicos gradualmente erodem o esmalte do dente e a dentina, e a dissolução crônica da matriz de fosfato de cálcio (hidroxiapatita) do dente leva ao estágio de formação de uma cavidade. O fluoreto, administrado topicamente ou presente na pasta de dente, em níveis tão baixos que conseguem inibir a enolase, integra-se à superfície do dente, formando fluoroapatita, a qual é mais resistente à desmineralização.

Regulação da glicólise em eritrócitos

Hexocinase

As CVS consomem a glicose de maneira estável e uniforme. Elas não são fisicamente ativas como o músculo e não requerem energia para transportar O_2 ou CO_2. A glicólise nas células vermelhas parece ser regulada simplesmente pela necessidade de energia da célula, primeiramente para a manutenção de gradientes iônicos. O balanço entre o consumo e a produção de ATP é controlado alostericamente em três sítios: nas reações da hexocinase, fosfofrutocinase-1 e piruvato cinase (Fig. 12.2). De acordo com a determinação da $V_{máx}$ de várias enzimas em lisados de CVS *in vitro*, a hexocinase apresenta a menor atividade de todas as enzimas glicolíticas. Sua atividade máxima é cerca de cinco vezes a taxa do consumo de glicose pelas CVS, porém está sujeita a uma inibição por *feedback* (alostérica) do seu produto, a Glc-6-P. A hexocinase apresenta 30% de homologia entre seus domínios *N*- e *C*-terminal, resultado da duplicação e fusão do gene original; a ligação a Glc-6-P ao domínio *N*-terminal inibe a atividade da enzima e a produção de Glc-6-P no sítio ativo do domínio *C*-terminal.

Fosfofrutocinase-1 (PFK-1)

A PFK-1 é o primeiro ponto de regulação da glicólise controlando diretamente o fluxo de Fru-6-P para Fru-1,6-BP e, indiretamente, através da reação da fosfoglicose isomerase, o nível de Glc-6-P e a inibição da hexocinase. Embora apresente atividade de 20 vezes superior à da hexocinase, a PFK-1 é fortemente inibida por ATP, de modo que sua atividade varia com o estado energético da célula. Surpreendentemente, o ATP tanto é substrato (Fig. 12.3) quanto inibidor alostérico (Fig. 12.7) da PFK-1, uma função dupla que permite o controle fino sobre a atividade da enzima.

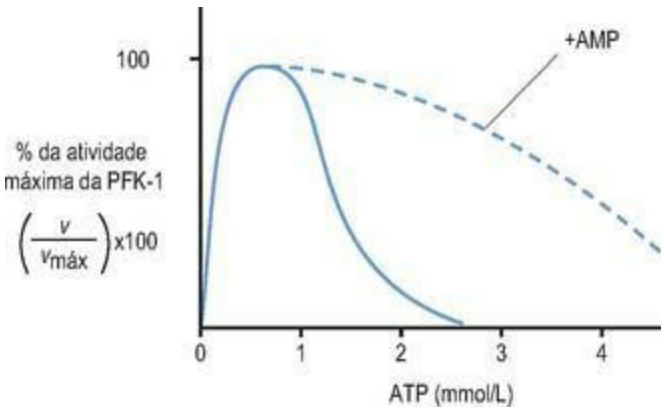


Fig. 12.7 Regulação alostérica da fosfofrutocinase-1 (PFK-1) pelo ATP. O AMP é um potente ativador da PFK-1 na presença de ATP.

Conforme mostrado na Figura 12.7, a concentração de ATP nas CVS (˜2 mmol/L) normalmente reprime a atividade da PFK-1. O AMP, que está presente em concentrações muito menores (˜0,05

mmol/L), atenua essa inibição. Por causa de suas concentrações relativas, a conversão de uma pequena fração de ATP a AMP nas CVS gera grande aumento relativo da concentração do AMP, o que ativa a PFK-1. O ADP também atenua a inibição da PFK-1 pelo ATP, porém sua concentração não se altera tanto com a utilização de energia. O AMP (e o ADP) não só atenua a inibição da PFK-1 pelo ATP, como também diminui a K_m para o substrato Fru-6-P, aumentando ainda mais a eficiência catalítica dessa enzima.

Como medido pelas concentrações relativas de ATP, ADP e AMP, a atividade da PFK-1 nas células vermelhas é seletivamente sensível a mudanças no estado energético da célula através de regulação alostérica. Na realidade, a atividade total da PFK-1 e, portanto, a velocidade da glicólise, depende da relação de concentrações (AMP + ADP)/ATP na célula. Esses produtos são interconversíveis pela reação da adenilato cinase:

$$2\ ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$$

Quando o ATP é consumido e o ADP aumenta, o AMP é formado pela reação da adenilato cinase. O aumento das concentrações de AMP atenua a inibição da PFK-1 pelo ATP, ativando a glicólise. A fosforilação do ADP durante a glicólise e do AMP pela reação da adenilato cinase gradualmente restaura a concentração de ATP ou a *carga energética* da célula e, à medida que a concentração de AMP diminui, a taxa de glicose decresce a um estado estacionário. A glicólise atua sob uma taxa constante e favorável na célula vermelha, onde o consumo de ATP é estável, porém a atividade dessa via muda rapidamente em resposta à utilização de ATP no músculo durante o exercício.

Piruvato cinase (PK)

Além da regulação pela hexocinase e PFK-1, a piruvato cinase no fígado é alostericamente ativada por Fru-1,6-BP, o produto da reação da PFK-1. Esse processo pode ser importante nos eritrócitos para limitar o acúmulo de intermediários do tipo trioses fosfato reativos no citosol.

Características das enzimas regulatórias

Cada uma das três enzimas envolvidas na regulação da glicólise — hexocinase, PFK-1 e piruvato cinase — tem os traços característicos de uma enzima regulatória: elas são enzimas diméricas ou tetraméricas cujas estruturas e atividades são responsivas a moduladores alostéricos; estão presentes com baixas $V_{máx}$ em comparação com outras enzimas da via e catalisam reações irreversíveis. A regulação da glicólise no fígado, no músculo e em outros tecidos é mais complicada do que nas CVS (Tabela 12.1) em função da maior variabilidade na taxa de consumo de combustível e da interação entre o metabolismo de carboidratos e de lipídios durante o metabolismo aeróbico. Nesses tecidos, a quantidade e a atividade das enzimas regulatórias são reguladas pelos seus efetores alostéricos através de modificações covalentes e por indução ou repressão da atividade enzimática.

Tabela 12.1 Regulação da glicólise na célula vermelha.

Regulaçâo da glicólise na célula vermelha	
Enzima	**Regulador**
Hexodnase	inibida por glicose-6-fosfato
Fosfofrutocinase-1	inibida por ATP; ativada por AMP
Piruvato cinase	ativada por frutose-1,6-BP

SÍNTESE DE 2,3-BISFOSFOGLICERATO

O 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG) (Fig. 12.8) é um importante produto da glicólise nas CVS, às vezes atingindo a concentração de 5 mmol/L, a qual é comparável à concentração molar de hemoglobina (Hb) na CVS. O 2,3-BPG é de fato o principal intermediário fosforilado no eritrócito, presente até em maiores concentrações do que o ATP (1-2 mmol/L) ou o fosfato inorgânico (1 mmol/L). O 2,3-bisfosfoglicerato é um efetor alostérico negativo da afinidade da Hb pelo O_2. Ele diminui a afinidade da hemoglobina pelo O_2promovendo a liberação de O_2 nos tecidos periféricos. A presença de 2,3-BPG nas CVS explica a observação de que a afinidade pelo O_2 da HbA purificada é maior do que a da Hb nas CVS. A concentração de 2,3-BPG aumenta nas CVS durante a adaptação a grandes altitudes, em doença pulmonar obstrutiva crônica e na anemia, promovendo a liberação de O_2 para os tecidos quando a tensão de O_2 e a saturação da hemoglobina diminuem no pulmão. A Hb fetal (HbF) é menos sensível do que a Hb de um adulto (HbA) aos efeitos do 2,3-BPG; a maior afinidade pelo oxigênio da HbF, mesmo na presença de 2,3-BPG, promove uma transferência eficiente de O_2 através da placenta da HbA para a HbF (Cap. 5).

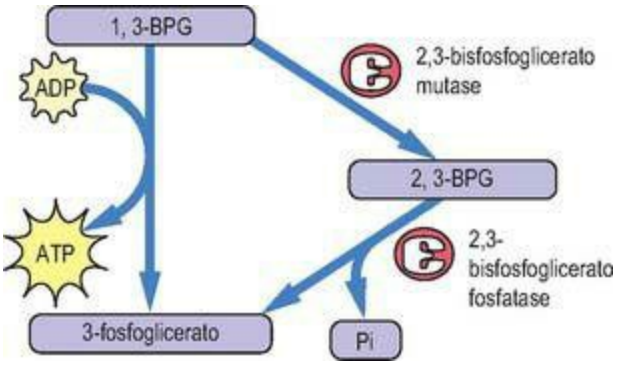


Fig. 12.8 Via para biossíntese e degradação do 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG). A BPG mutase catalisa a conversão de 1,3-BPG em 2,3-BPG. Essa mesma enzima tem atividade de bisfosfoglicerato fosfatase, controlando assim tanto a síntese quanto a hidrólise do 2,3-BPG. Observe que essa via desvia a reação da fosfoglicerato cinase, de modo que a geração de ATP por mol de glicose é diminuída a zero.

A VIA DAS PENTOSES FOSFATO

Visão geral

A via das pentoses fosfato é uma via citosólica presente em todas as células, assim chamada por ser a via principal de formação de pentoses fosfato para síntese de nucleotídeos e posterior incorporação ao DNA e RNA. Essa via se ramifica a partir da glicólise na etapa de formação da Glc-6-P, daí a sua designação alternativa, de desvio da hexose monofosfato. A via das pentoses fosfato é, às vezes, mais bem descrita como um desvio do que como uma via porque, quando as pentoses não são necessárias para reações biossintéticas, os intermediários das pentoses fosfato são reciclados para a glicólise através da conversão em Fru-6-P e gliceraldeído-3-fosfato. Esse redirecionamento é especialmente importante nas CVS e em células quiescentes que não estão dividindo, onde há necessidade limitada da síntese de DNA e RNA.



DEFICIÊNCIA EM PIRUVATO CINASE

Uma criança apresentou icterícia e sensibilidade abdominal (área esplênica). Testes de laboratório revelaram baixo hematócrito, baixa concentração de hemoglobina, eritrócitos normocrômicos com morfologia normal e reticulocitose branda. A bilirrubina sérica estava aumentada.

Comentário. A deficiência de piruvato cinase é a anemia hemolítica mais comum que resulta da deficiência de uma enzima glicolítica. É uma desordem autossômica recessiva que ocorre com uma frequência de 1/10.000 (frequência gênica de 1%) na população mundial. Fica em segundo lugar apenas em relação à deficiência de G6PDH como causa enzimática de anemia hemolítica. Essas doenças são diagnosticadas pela dosagem dos níveis enzimáticos ou de metabólitos nos eritrócitos, demonstrando anormalidades nas atividades enzimáticas, ou por análise genética. Instabilidade térmica, aumento da K_m para o PEP e decréscimo da ativação pela Fru-1,6-BP caracterizam defeitos enzimáticos da piruvato cinase.

A deficiência de piruvato cinase varia significativamente em gravidade, desde uma condição leve, compensada, que requer pequenas intervenções a uma doença severa que requer transfusões. A anemia resulta da incapacidade de sintetizar ATP, necessário para a manutenção do metabolismo das CVS, dos gradientes iônicos e da forma da célula. Curiosamente, os pacientes podem tolerar a anemia muito bem. Mesmo com anemia branda, o acúmulo de 2,3-bisfosfoglicerato em suas CVS diminui a afinidade do oxigênio pela hemoglobina, promovendo a liberação de oxigênio para o músculo durante o exercício e até mesmo para o feto durante a gravidez.

O NADPH é o principal produto da via das pentoses fosfato em todas as células. Em tecidos que têm biossíntese ativa de lipídios (p. ex., o fígado, o córtex adrenal ou as glândulas mamárias), o NADPH é usado em reações redox necessárias para a biossíntese de colesterol, sais biliares, hormônios esteroides e triglicerídeos. O fígado também utiliza NADPH para reações de hidroxilação envolvidas na desintoxicação e excreção de drogas. As CVS têm pequena atividade biossintética, mas ainda assim desviam cerca de 10% da glicose para a via das pentoses fosfato, nesse caso quase exclusivamente para a produção de NADPH. O NADPH é usado principalmente para a redução de um tripeptídeo contendo cisteína, a glutationa (GSH), um cofator essencial para a proteção

antioxidante (Cap. 37).

GLICÓLISE EM CÉLULAS TUMORAIS

Os tumores são frequentemente "glicolíticos', isto é, apresentam aumento na dependência da glicólise como fonte de energia. O aumento da glicólise pode ser resultado da disfunção mitocondrial como consequência de hipóxia, possivelmente por causa da necessidade metabólica das rápidas divisões das células tumorais, excedendo assim o suprimento de oxigênio e nutrientes a partir do sangue. Nesses casos, a produção e o acúmulo de lactato se tornam tóxicos para as células tumorais, contribuindo para a necrose e a formação de núcleo necrótico no tumor. Alguns tumores secretam citocinas que promovem angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos), aumentando desse modo o fornecimento de combustível e oxigênio, e assim levando a um aumento do crescimento do tumor. Inibidores de angiogênese, desenvolvidos para inibir a vascularização do tumor, estão sendo avaliados como alternativas não cirúrgicas para a terapia do tumor. A capacidade de sobrevivência por manterem a glicólise em meios hipóxicos pode ser um fator importante no crescimento e sobrevivência do tumor.

A via das pentoses fosfato é dividida em um estágio redox irreversível, o qual gera tanto NADPH quanto pentoses fosfato, e em um estágio de interconversão reversível, no qual o excesso de pentoses fosfato é convertido em intermediários da via glicolítica. Ambos os estágios são importantes nas CVS, já que elas necessitam do NADPH para redução da glutationa, mas necessidade limitada para a síntese "*de novo*" de pentoses.

O estágio redox da via das pentoses fosfato — síntese de NADPH

O NADPH é sintetizado por duas desidrogenases, na primeira e na terceira reação da via das pentoses fosfato (Fig. 12.9). Na primeira etapa da via, a reação da Glc-6-P desidrogenase (G6PDH) produz NADPH pela oxidação da Glc-6-P a ácido 6-fosfoglicônico lactona, um éster de açúcar cíclico. A lactona é hidrolisada a ácido 6-fosfoglicônico pela lactonase. A descarboxilação oxidativa do 6-fosfogliconato, catalisada pela 6-fosfogliconato desidrogenase, gera uma cetose, a ribulose-5-fosfato, mais 1 mol de CO_2 e o segundo mol de NADPH.

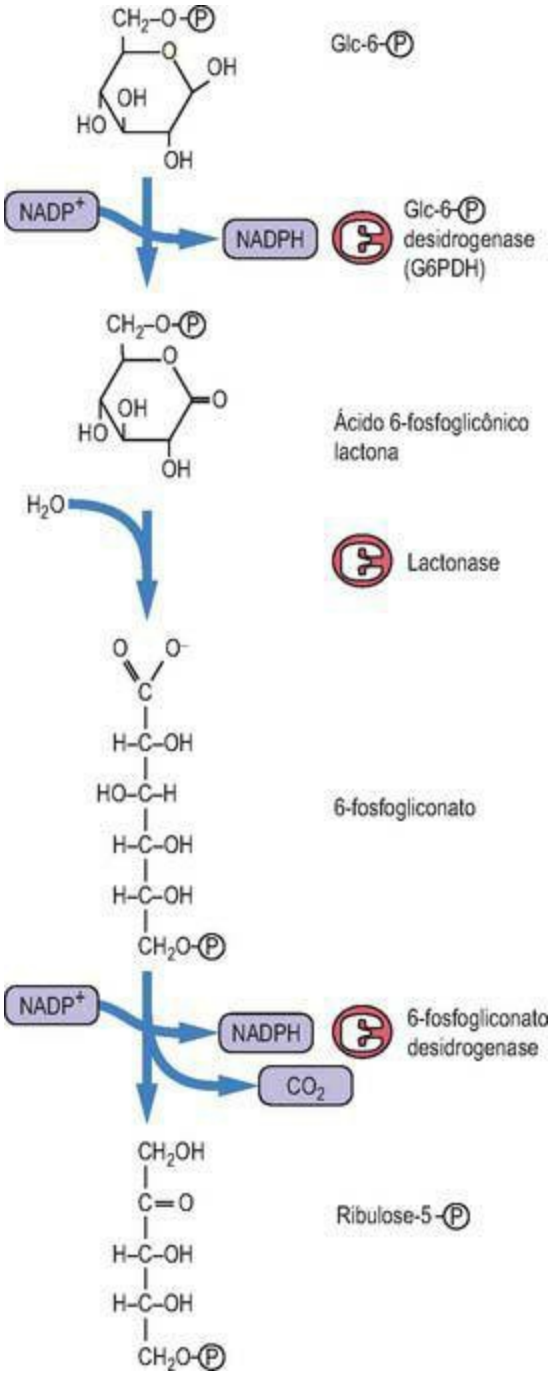


Fig. 12.9 O estágio redox da via das pentoses fosfato. Uma sequência de três enzimas forma dois moles de NADPH por mol de Glc-6-P, o qual é convertido a ribulose-5-fosfato com liberação de CO_2.

A G6PDH e a 6-fosfogliconato desidrogenase mantêm a relação citoplasmática de $NADPH/NAD^+$ em aproximadamente 100. Curiosamente, já que o NAD^+ é necessário para a glicólise, a taxa de $NADH/NAD^+$ no citoplasma é próxima do inverso, menos de 0,01. Embora as concentrações totais (formas oxidadas mais as reduzidas) de NAD(H) e NADP(H) nas CVS sejam similares (˜25 μmol/L), a célula mantém esses dois sistemas redox com potenciais redox parecidos em diferentes pontos na mesma célula através do isolamento do seu metabolismo pela especificidade das desidrogenases citoplasmáticas. As enzimas glicolitícas (GAPDH e LDH) utilizam somente o NAD(H), enquanto as enzimas da via das pentoses fosfato utilizam somente NADP(H). Não existem enzimas nas CVS que catalisem a redução do NAD^+ pelo NADPH, de tal forma que podem existir simultaneamente no mesmo compartimento níveis elevados de NAD^+ e de NADPH.

O estágio de interconversão da via das pentose-fosfato

Em células com síntese ativa de ácidos nucleicos, a ribulose-5-fosfato formada a partir da reação da 6-fosfogliconato desidrogenase, é isomerizada a ribose 5-fosfato para a síntese de ribo e desoxirribonucleotídeos para a formação de RNA e DNA (Fig. 12.10). Em células que não estão em divisão, as pentoses fosfato voltam para a glicólise. Isso acontece por uma série de reações de equilíbrio na qual três moles de ribulose-5-fosfato são convertidos a dois moles de Fru-6-P e um mol de gliceraldeído-3-fosfato. Certas restrições são impostas nas reações de interconversão — elas devem ser executadas somente pela transferência de duas ou três unidades de carbono entre os açúcares fosfato. Cada reação deve também envolver uma cetose doadora e uma aldose receptora. Isomerases e epimerases convertem a ribulose-5-fosfato em substratos aldose e cetose-fosfato para o estágio de interconversão. A transcetolase, uma enzima dependente de timina, catalisa as reações de transferência de dois carbonos. A transaldolase age de forma similar à aldolase na glicólise, exceto pelo fato de que a unidade de três carbonos é transferida a outro açúcar, em vez de ser liberado como uma triose fosfato para a glicólise.

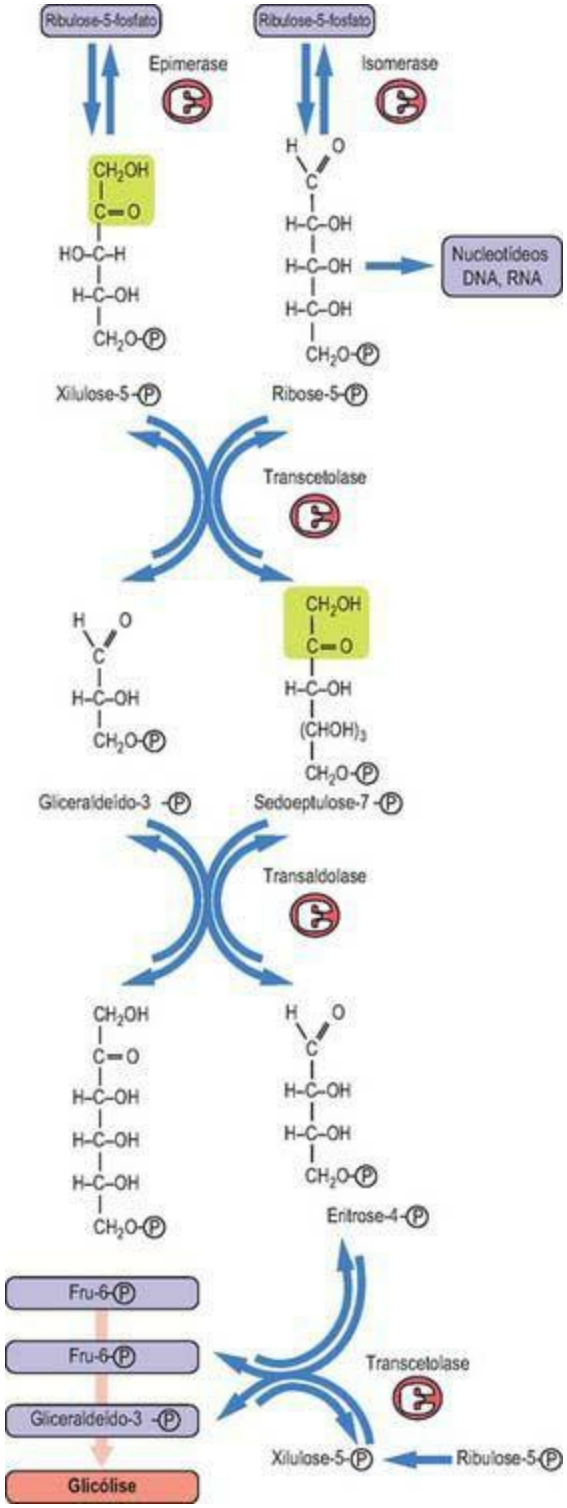


Fig. 12.10 O estágio de interconversão da via das pentoses fosfato. Os esqueletos carbônicos de três moléculas de ribulose-5-fosfato são desviados para formar duas moléculas de Fru-6-P e uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato, os quais entram na via glicolítica.

Como mostrado na Figura 12.10 e na Tabela 12.2, duas moléculas de ribulose-5-fosfato, o primeiro produto pentose do estágio redox, são convertidas em produtos separados: uma molécula é isomerizada a uma aldose, a ribose-5-fosfato, e a outra sofre epimerização à xilulose-5-fosfato. A transcetolase catalisa então a transferência de dois carbonos da xilulose-5-fosfato para a ribose-5-fosfato, resultando em uma cetose de sete carbonos, a sedoeptulose-7-fosfato, e em um açúcar de três carbonos, o gliceraldeído-3-fosfato. A transaldolase, por sua vez, catalisa a transferência de três carbonos entre os dois produtos da transcetolase, da sedoeptulose-7-fosfato para o gliceraldeído-3-fosfato, resultando no primeiro intermediário da via glicolítica, a Fru-6-fosfato, e em uma eritrose-4-

fosfato residual. Uma terceira molécula de xilulose-5-fosfato dos dois carbonos para a eritrose-4-fosfato em uma segunda reação da transcetolase, gerando uma segunda molécula de Fru-6-P e uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato, e ambas entram na via glicolítica.

Tabela 12.2 Resumo das reações de equilíbrio na via das pentoses fosfato.

Substrato(s)		Produto(s)	Enzima
Ribulose-5-P	⇌	Ribose-5-P	isomerase
2-Ribulose-5-P	⇌	2-Xilulose-5-P	epimerase
Xilulose-5-P + Ribose-5- P	⇌	Gliceraldeído-3-P + Sedoeptulose-7-P	transcetolase
Sedoeptulose-7-P + Gliceraldeído-3-P	⇌	Eritrose-4-P + Frutose-6-P	transaldolase
Xilulose-5-P + Eritrose-4-P	⇌	Gliceraldeído-3-P + Frutose-6-P	transcetolase
3 Ribulose-5-P	⇌	Gliceraldeído-3-P + 2-Frutose-6-P	

Assim, três açúcares fosfato de cinco carbonos (ribulose-5-fosfato) formados no estágio redox da via das pentoses fosfato são convertidos em intermediários da glicólise, sendo um com três carbonos (gliceraldeído-3-fosfato) e dois com seis carbonos (frutose-6-fosfato). Nas CVS, esses intermediários da via glicolítica normalmente continuam a via gerando lactato, mostrando que a glicose é só temporariamente desviada da via central da glicólise

Função da via das pentoses fosfato na célula vermelha

A glutationa (GSH) é um tripeptídeo γ-glutamil-cisteinil-glicina (Fig. 12.11). Está presente nas células na concentração de 2-5 mmol/L, sendo 99% na forma reduzida (tiol), e é uma coenzima essencial para a proteção da célula contra vários insultos oxidativos e químicos (Cap. 37). A maior parte do NADPH formado na célula vermelha é utilizada pela glutationa redutase para manter a GSH no estado reduzido. Durante sua função como coenzima para atividades antioxidantes, a GSH é oxidada à forma dissulfeto, GSSG, a qual é posteriormente regenerada pela ação da glutationa redutase (Fig. 12.12).

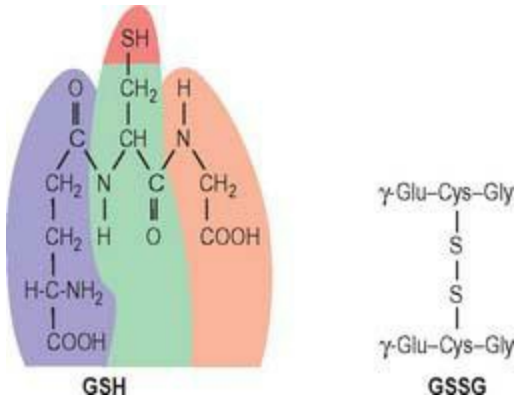


Fig. 12.11 Glutationa. Estrutura da glutationa reduzida (GSH) e da glutationa oxidada (GSSG).

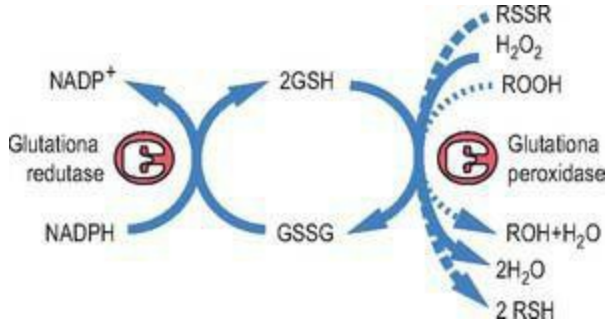


Fig. 12.12 Atividades antioxidantes da glutationa. A GSH é a coenzima para a glutationa peroxidase, a qual desintoxica o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos (lipídios). O peróxido de hidrogênio e os peróxidos lipídicos são formados espontaneamente na célula vermelha, catalisado pela reação colateral do ferro hêmico durante o transporte de oxigênio pela hemoglobina (Cap. 37). A GSH também reduz as ligações dissulfeto nas proteínas, formadas durante o estresse oxidativo.

A GSH tem uma variedade de funções protetoras na célula. A glutationa peroxidase (GPx) é encontrada em todas as células e utiliza a GSH para desintoxicação do peróxido de hidrogênio e peróxidos inorgânicos (lipídios) no citosol e nas membranas celulares (Fig. 12.12). Como a GPx contém um resíduo seleno-cisteína em seu sítio ativo, o selênio, o qual é necessário em pouca quantidade na dieta, é frequentemente descrito como um nutriente antioxidante (Cap. 11).

A GSH também age como um tampão sulfidrila intracelular, mantendo os grupamentos -SH expostos nas proteínas e enzimas no estado reduzido. Sob circunstâncias normais, quando as proteínas são expostas ao O_2, seus grupamentos sulfidrila livres gradualmente se oxidam para formar

dissulfetos, formando ligações cruzadas intramoleculares ou intermoleculares com outras moléculas de proteínas. Na célula vermelha, a GSH mantém os grupamentos -SH da hemoglobina no estado reduzido, inibindo as ligações cruzadas oxidativas da proteína.

A DEFICIÊNCIA DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE CAUSA ANEMIA HEMOLÍTICA

Logo antes de uma viagem planejada para os trópicos, um paciente visitou seu médico, reclamando de fraqueza e de que sua urina tornou-se inexplicavelmente escura recentemente. O exame médico revelou esclerótica levemente ictérica (amarela). Os testes de laboratório indicaram baixo hematócrito, alta contagem de reticulócitos e aumento significativo dos níveis sanguíneos de bilirrubina. O paciente se apresentara com boa saúde durante uma visita havia um mês, quando recebeu imunizações e prescrições para drogas antimaláricas.

Comentário. Uma série de drogas, particularmente a primaquina e os antimaláricos relacionados, sofrem reações redox na célula produzindo altas quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Cap. 37). As EROs causam oxidação dos grupamentos -SH na hemoglobina e peroxidação dos lipídios de membrana. Algumas pessoas têm um defeito genético na G6PDH, gerando uma enzima tipicamente instável, com meia-vida menor na CVS, ou extraordinariamente sensível à inibição pelo NADPH. Nos outros casos, a diminuição da atividade dessa enzima e a produção insuficiente de NADPH sob estresse diminuem a capacidade da célula de reciclar GSSG em GSH, e o estresse oxidativo induzido por drogas leva ao dano excessivo e à lise das CVS (hemólise), além de anemia hemolítica. A bilirrubina, um produto do metabolismo do heme, sobrecarrega as vias da desintoxicação hepática, se acumulando no plasma e nos tecidos, causando icterícia. Se a hemólise é suficientemente severa, a Hb extravasa para a urina, resultando em hematúria e urina de coloração escura. Os corpos de Heinz, agregados de ligações cruzadas dissulfeto de hemoglobina também são aparentes nas amostras de sangue. A deficiência de G6PDH é assintomática, exceto em resposta a um desafio oxidativo, o qual pode ser induzido por drogas (antimaláricos, sulfas), dieta (feijão de fava) ou infecções severas.

Existem cerca de 200 mutações conhecidas para o gene da G6DPH, gerando ampla variação na severidade da doença. As CVS parecem ser especialmente sensíveis ao estresse oxidativo porque, diferentemente de outras células, não podem sintetizar nem substituir suas enzimas. As células mais velhas, que possuem menor atividade de G6PDH, são, portanto, particularmente afetadas. A atividade de todas as enzimas nas CVS diminui com o tempo, e a morte celular eventualmente resulta a partir da incapacidade das células de produzirem ATP suficiente para a manutenção de gradientes iônicos celulares. O decréscimo gradual na atividade da via das pentoses fosfato em células mais velhas é um mecanismo que leva às ligações cruzadas oxidativas das proteínas de membrana e ao *turnover* dos eritrócitos no baço.

Resumo

Este capítulo descreve duas vias metabólicas antigas comuns a todas as células do corpo: a glicólise e a via das pentoses fosfato. A célula vermelha, que não possui mitocôndrias e metabolismo oxidativo, e, portanto, obtém todo o seu ATP através da glicólise, é usada como modelo para a introdução dessas vias. A glicólise anaeróbica nas células vermelhas produz uma quantidade limitada de ATP pela conversão de um açúcar de seis carbonos, a glicose, em duas moléculas do hidroxiácido de três carbonos (lactato). Através de uma série de intermediários açúcares fosfatos, a glicólise fornece metabólitos para pontos de ramificação com outras vias metabólicas, incluindo a via das pentoses fosfato. Essa via promove a geração de pentoses para a síntese de DNA e RNA em células nucleadas e NADPH para reações biossintéticas. O NADPH também é necessário para a manutenção da glutationa reduzida, que é um cofator essencial para os sistemas de defesa antioxidantes que protegem a célula contra o estresse oxidativo.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Por que a glicose foi escolhida como açúcar sanguíneo durante a evolução, preferencialmente a outros açúcares, (p. ex., galactose, frutose ou sacarose)?

2. Descreva as reações enzimáticas acopladas, usando somente as enzimas das células vermelhas e um espectrofotômetro para dosar a produção ou consumo de NAD(P)(H), que podem ser usadas para dosar as concentrações de glicose sanguínea e lactato.

3. Explique a origem metabólica da acidose em doença pulmonar crônica obstrutiva.

Leituras sugeridas

Gatenby RA, Gillies RJ. Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:1358-1366.

Krol DM, Nedley MP. Dental caries: state of the science for the most common chronic disease of childhood. *Adv Pediatr*. 2007;54:215-239.

Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev*. 2007;21:267-283.

Tozzi MG, Camici M, Mascia L, Sgarrella F, Ipata PL. Pentose phosphates in nucleoside interconversion and catabolism. *FEBS J*. 2006;273:1089-1101.

van Wijk R, van Solinge WW. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood*. 2005;106:4034-4042.

Zanella A, Fermo E, Bianchi P, Chiarelli LR, Valentini G. Pyruvate kinase deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev*. 2007;21:217-231.

Sites

American Society of Hematology, estudos de casos de anemia. www.ashteachingcases.org.

National Institute of Health. www.nih.gov/medlineplus/ency/article/000528.htm

www.emedicine.com E-Medicine: www.emedicine.com/med/topic1980.htm.topic900.htm

Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. www.rialto.com/g6pd/.

Animações Animações – glicólise

- www.tcd.ie/Biochemistry;IUBMB-Nicholson/sfw/glycolysis.swf
- http://trc.ucdavis.edu/biosci10v/bis10v/media/ch06/glycolysis.swf
- www.northland.cc.mn.us/biology/Biology1111/animations/glycolysis.html

Animação Animação — Via das pentoses-fosfato

- www.uwsp.edu/chemistry/tzamis/p3animrunP.gif

Armazenamento e Síntese de Carboidratos no Fígado e no Músculo

J.W. Baynes

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a estrutura do glicogênio.
- Identificar os locais primários de armazenamento de glicogênio no corpo e a função do glicogênio nesses tecidos.
- Resumir as vias metabólicas para a síntese e a degradação do glicogênio.
- Descrever o mecanismo pelo qual o glicogênio é mobilizado do fígado em resposta ao glucagon, no músculo durante o exercício e em ambos os tecidos em resposta à epinefrina.
- Explicar a origem e as consequências das doenças de armazenamento do glicogênio no fígado e no músculo.
- Explicar o mecanismo de contrarregulação da glicogenólise e glicogênese no fígado.
- Resumir a via da gliconeogênese, incluindo os substratos, enzimas únicas e mecanismos regulatórios.
- Descrever os papéis complementares da glicogenólise e gliconeogênese na manutenção da concentração sanguínea de glicose.

INTRODUÇÃO

A célula vermelha e o cérebro têm uma necessidade absoluta de glicose sanguínea para o metabolismo energético. Essas células consomem cerca de 80% dos 200 g de glicose consumida no corpo por dia. Existem somente cerca de 10 g de glicose no plasma e no volume de fluido extracelular, de tal forma que a glicose sanguínea tem de ser reabastecida constantemente. Do contrário, a hipoglicemia se desenvolve e compromete a função cerebral, levando à confusão e à desorientação e possivelmente ao coma com risco de vida em concentração de glicose sanguínea abaixo de 2,5 mmol/L (45 mg/dL). Absorvemos glicose a partir de nossos intestinos por somente 2-3 horas após uma refeição contendo carboidrato; assim tem de existir um mecanismo para a manutenção da glicose sanguínea entre as refeições.

O glicogênio, uma forma de armazenamento de glicose como polissacarídeo, é nossa primeira linha de defesa contra o declínio na concentração sanguínea de glicose. Durante e imediatamente após uma refeição, a glicose é convertida em glicogênio, um processo conhecido como glicogênese, tanto no fígado quanto no músculo. A concentração tecidual de glicogênio é maior no fígado do que no músculo, mas em função da massa relativa de músculo e fígado a maioria do glicogênio no corpo é armazenada no músculo (Tabela 13.1).

Tabela 13.1 Distribuição tecidual das reservas de energia de carboi-dratos (adulto de 70 kg).

Tecido	Tipo	Quantidade	% da massa tecidual	Calorias
fígado	glicogênio	75 g	3–5%	300
músculo	glicogênio	250 g	0,5–1,0%	1.000
sangue e fluido extracelular	glicose	10 g	–	40

O glicogênio hepático é gradualmente degradado entre as refeições, pela via da glicogenólise, liberando glicose para manter a concentração sanguínea de glicose. Entretanto, os estoques de glicogênio total hepático são suficientes apenas para a manutenção da concentração sanguínea de glicose durante 12 horas de jejum.

Durante o sono, quando não estamos comendo, existe uma mudança gradual da glicogenólise para a síntese *de novo* de glicose, também uma via hepática, conhecida como gliconeogênese (Fig. 13.1). A gliconeogênese é essencial para a sobrevivência durante o jejum ou a inanição, quando os estoques de glicogênio são negligenciáveis. O fígado usa aminoácidos das proteínas musculares como precursores primários de glicose, mas também faz uso do lactato da glicólise e do glicerol do catabolismo de gorduras. Os ácidos graxos, mobilizados dos estoques de triglicerídeos do tecido adiposo, fornecem energia para a gliconeogênese.

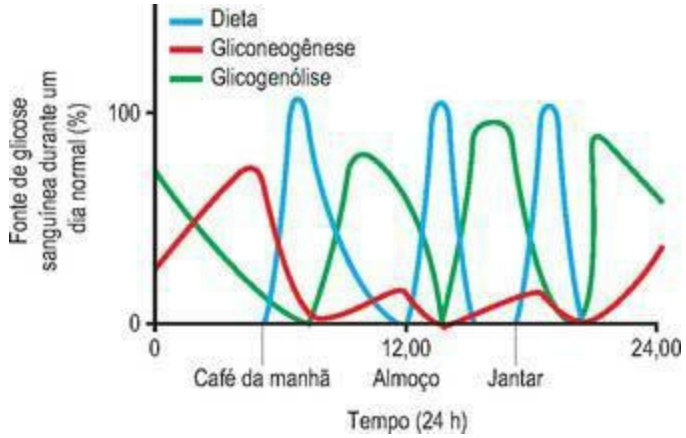


Fig. 13.1 Fontes de glicose sanguínea durante um dia normal. Entre as refeições, a glicose sanguínea é derivada primariamente do glicogênio hepático. Dependendo da frequência da alimentação, a glicogenólise e a gliconeogênese podem ser mais ou menos ativas durante o dia. Tarde da noite ou de manhã cedo, após a depleção de uma fração importante do glicogênio hepático, a gliconeogênese se torna a fonte primária de glicose sanguínea.

O glicogênio muscular não está disponível para a manutenção da glicose sanguínea. A glicose obtida do sangue e do glicogênio é usada exclusivamente para o metabolismo energético no músculo, especialmente durante a explosão de uma atividade física. Embora os músculos cardíaco e esquelético contem com as gorduras como suas fontes primárias de energia, algum metabolismo de glicose é essencial para o metabolismo eficiente da gordura nesses tecidos.

Este capítulo descreve as vias de glicogênese e glicogenólise no fígado e músculo e a via da gliconeogênese no fígado.

ESTRUTURA DO GLICOGÊNIO

O glicogênio é um polissacarídeo ramificado de glicose, um homoglicano. Ele contém somente dois tipos de ligações glicosídicas, cadeias com resíduos de glicose unidos por ligações α1-4 com ramificações α1-6 espaçadas cerca de cada 4-6 resíduos em toda a extensão da cadeia α1-4 (Fig. 13.2). O glicogênio está intimamente relacionado ao amido, o polissacarídeo de armazenamento das plantas, mas o amido consiste em uma mistura de amilose e amilopectina. O componente amilose contém somente cadeias α1-4 lineares; o componente amilopectina tem uma estrutura mais parecida com a do glicogênio, mas com menos ramificações α1-6, cerca de uma para cada 12 resíduos de glicose unidos por ligações α1-4. A estrutura total do glicogênio é dendrítica por natureza, expandindo-se a partir de uma sequência central ligada a um resíduo de tirosina na proteína glicogenina e desenvolvendo-se para uma estrutura final semelhante a uma cabeça de couve-flor. As enzimas do metabolismo do glicogênio estão ligadas à superfície da partícula de glicogênio; muitas moléculas de glicose terminais na superfície da molécula fornecem fácil acesso para a rápida liberação de glicose a partir do polímero de glicogênio.

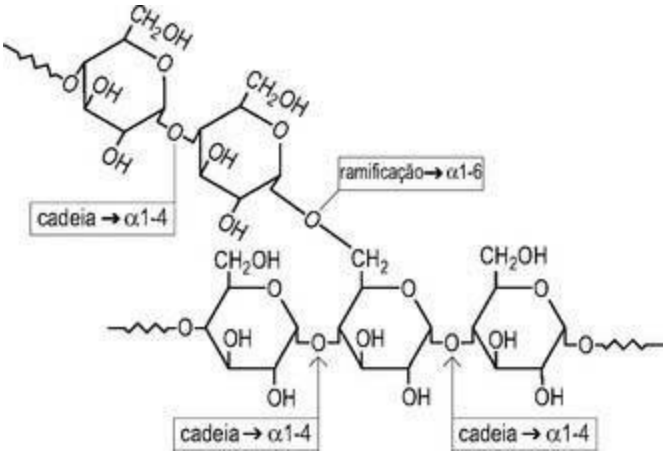


Fig. 13.2 Estrutura do glicogênio. A figura mostra as ligações α1-4 e o ponto de ramificação com a ligação α1-6. O glicogênio é armazenado como grânulos no citoplasma das células hepáticas e musculare

VIA DE GLICOGÊNESE A PARTIR DA GLICOSE SANGUÍNEA NO FÍGADO

O fígado é rico no transportador de glicose GLUT-2 de alta capacidade e baixa afinidade (K_m >10 mmol/L), o que o torna livremente permeável à glicose liberada em altas concentrações no sangue portal durante e após uma refeição (Tabela 8.2). O fígado também é rico em glicocinase, uma enzima que é específica para a glicose e a converte em glicose 6-fosfato (Glc-6-P). A glicocinase (GK) é induzível pelo consumo continuado de dieta rica em carboidrato. Ela tem alta K_m, cerca de 5-7 mmol/L, de modo que sua atividade aumenta à medida que a glicose portal aumenta acima do normal de 5 mmol/L (100 mg/dL) da concentração sanguínea de glicose. Ao contrário da hexocinase, a GK não é inibida pela Glc-6-P, de tal forma que a concentração de Glc-6-P aumenta rapidamente no fígado após uma refeição rica em carboidrato, forçando a entrada de glicose nas principais vias do metabolismo de glicose: glicólise, via das pentoses fosfato e glicogênese (Fig. 12.2). A glicose é canalizada para a síntese de glicogênio, fornecendo uma reserva de carboidrato para a manutenção da glicose sanguínea durante o estado pós-absortivo. A Glc-6-P em excesso no fígado, além da necessária para restabelecer as reservas de glicogênio, é então afunilada para a glicólise, em parte para a produção de energia, mas primariamente para a conversão em ácidos graxos e triglicerídeos, que são exportados para armazenamento no tecido adiposo. A glicose que passa através do fígado causa um aumento na concentração de glicose sanguínea periférica após refeições ricas em carboidratos. Essa glicose é usada no músculo para a síntese e o armazenamento de glicogênio e no tecido adiposo como fonte de glicerol para a biossíntese de triglicerídeos.

A via da glicogênese a partir da glicose (Fig. 13.3A) envolve quatro etapas:

- conversão de Glc-6-P em glicose-1-fosfato (Glc-1-P) pela fosfoglicomutase
- ativação da Glc-1-P em uridina difosfato (UDP)-glicose pela enzima UDP-glicose pirofosforilase
- transferência de glicose da UDP-Glc para o glicogênio com ligações α1-4 pela glicogênio sintase, um membro da classe de enzimas conhecidas como glicosil transferases
- quando a cadeia α1-4 excede oito resíduos em comprimento, a enzima ramificadora do glicogênio, uma transglicosilase, transfere alguns dos açúcares com ligações α1-4 para uma ramificação α1-6, permitindo o alongamento contínuo de ambas as cadeias α1-4 até que elas, sucessivamente, se tornem longas o suficiente para a transferência pela enzima de ramificação.

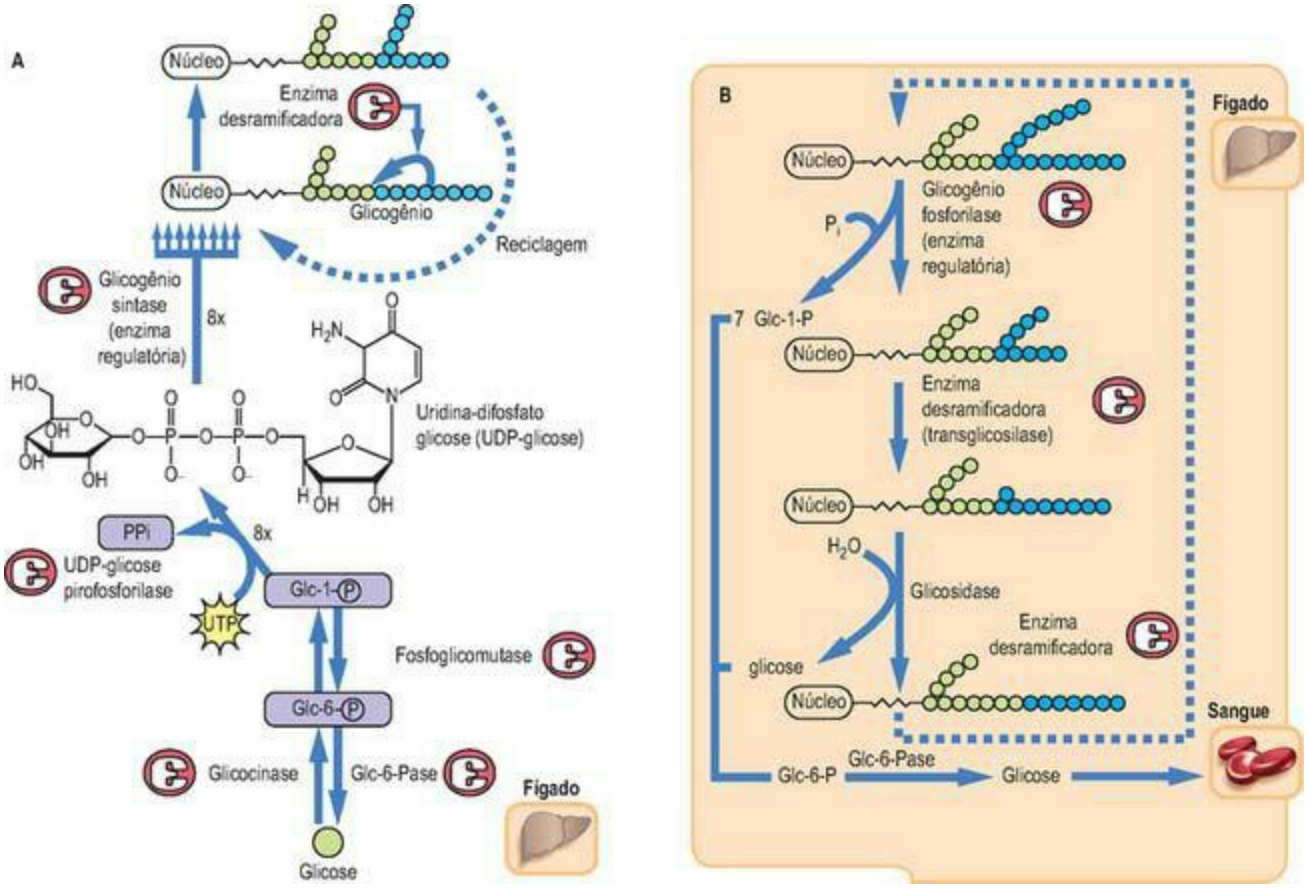


Fig. 13.3 Vias da glicogênese (A) e da glicogenólise (B).

A glicogênio sintase é a enzima regulatória da glicogênese, em vez da UDP-glicose fosforilase, porque a UDP-glicose também é usada para a síntese de outros açúcares e como um doador glicosil para a síntese de glicoproteínas, glicolipídeos e proteoglicanos (Caps. 26–282728). O pirofosfato (PPi), o outro produto da reação da pirofosforilase, é rapidamente hidrolisado a fosfato inorgânico pela pirofosfatase; essa reação fornece a força termodinâmica para a biossíntese de glicogênio.

VIA DA GLICOGENÓLISE NO FÍGADO

Assim como a maioria das vias metabólicas, enzimas separadas, algumas vezes em compartimentos subcelulares separados, são necessárias para vias reversas. A via da glicogenólise (Fig. 13.3B) se inicia com a remoção dos abundantes resíduos de glicose externos unidos por ligações α1-4 no glicogênio. Isso é consumado não por uma hidrolase, mas pela glicogênio fosforilase, uma enzima que usa o fosfato citosólico e libera glicose do glicogênio na forma de Glc-1-P. A Glc-1-P é isomerizada pela fosfoglicomutase a Glc-6-P, colocando-a no topo da via glicolítica; a reação de fosforilase, com efeito, desvia a necessidade por ATP nas reações da hexocinase e glicocinase. No fígado, a glicose é liberada da Glc-6-P pela glicose-6-fosfatase (Glc-6-Pase) e a glicose sai via o transportador GLUT-2 para o sangue. O passo regulatório, limitante da velocidade na glicogenólise, é catalisado pela fosforilase, a primeira enzima na via.

A fosforilase é específica para ligações glicosídicas α1-4; ela não pode quebrar ligações α1-6. Ademais, essa grande enzima não pode alcançar eficientemente os resíduos de glicose das ramificações. Assim, como mostrado na Figura 13.3B, a fosforilase cliva os resíduos externos de glicose até que as ramificações tenham três ou quatro resíduos de extensão, então a enzima desramificadora, que tem as atividades de transglicosilase e de glicosidade, move um pequeno segmento de resíduos de glicose ligados às ramificações α1-6 para a porção terminal de uma cadeia α1-4 adjacente, deixando um único resíduo de glicose no ponto de ramificação. Essa glicose é então removida pela atividade exo-1,6-glicosidase desramificadora, permitindo que a glicogênio fosforilase proceda com a degradação da extensão da cadeia α1-4 até que outro ponto de ramificação se aproxime, permitindo a repetição das reações da transglicosilase e glicosidase. Cerca de 90% da glicose é liberada do glicogênio como Glc-1-P, e o remanescente, derivado dos resíduos da ramificação α1-6, como glicose livre.

DOENÇA DE VON GIERKE: DOENÇA DO ARMAZENAMENTO DO GLICOGÊNIO CAUSADA PELA DEFICIÊNCIA DE GLC-6-PASE

Um bebê estava cronicamente adoentado, irritável, com sudorese e letárgico, e demandava alimentação frequente. A avaliação física indicou abdômen estendido, resultado de fígado aumentado. A glicose sanguínea, medida 1 h após alimentação foi de 3,5 mmol/L (70 mg/dL); valor normal: ≈5 mmol/L (100 mg/dL). Após 4 h, quando a criança exibia irritabilidade e sudorese, sua frequência cardíaca estava aumentada (pulso = 110) e a glicose sanguínea havia declinado para 2 mmol/L (40 mg/dL). Esses sintomas foram corrigidos pela alimentação. Uma biópsia hepática mostrou deposição maciça de partículas de glicogênio no citosol hepático.

Comentário: Essa criança não pode mobilizar glicogênio. Por causa da severidade da hipoglicemia, a mutação mais provável é na Glc-6-Pase hepática, que é necessária para a produção de glicose pela glicogenólise e pela gliconeogênese. O tratamento envolve alimentação frequente com carboidratos de digestão lenta, por exemplo, amido não cozido e gotejamento de alimentação nasogástrica durante a noite.

REGULAÇÃO HORMONAL DA GLICOGENÓLISE HEPÁTICA

A glicogenólise é ativada no fígado em resposta a uma demanda de glicose sanguínea, por causa de sua utilização durante o estado pós-absortivo ou em preparação para a utilização aumentada de glicose em resposta a estresse. Existem três principais ativadores hormonais da glicogenólise: glucagon, epinefrina (adrenalina) e cortisol (Tabela 13.2).

Tabela 13.2 Hormônios envolvidos no controle da glicogenólise.

Hormônio	Fonte	Iniciador	Efeito na glicogenólise
glucagon	células α pancreáticas	hipoglicemia	ativação rápida
epinefrina	medula adrenal	estresse agudo, hipoglicemia	ativação rápida
cortisol	córtex adrenal	estresse crônico	ativação crônica
insulina	células β pancreáticas	hiperglicemia	inibição

O glucagon é um hormônio peptídeo (3.500 Da), secretado pelas células α do pâncreas endócrino. Sua função primária é ativar a glicogenólise hepática para a manutenção da concentração sanguínea de glicose normal (normoglicemia). O glucagon tem uma pequena meia-vida no plasma, cerca de 5 min, como resultado da ligação ao receptor, filtração renal e inativação proteolítica no fígado. A concentração de glucagon no plasma, portanto, muda rapidamente em resposta às necessidades por glicose sanguínea. O glucagon sanguíneo aumenta entre as refeições, diminui durante uma refeição e está cronicamente aumentado durante o jejum ou em uma dieta pobre em carboidratos (Cap. 21).

A glicogenólise também é ativada em resposta a estresse agudo e crônico. O estresse pode ser:

- fisiológico: por exemplo, em resposta à utilização aumentada de glicose sanguínea durante o exercício
- patológico: por exemplo, como resultado de perda de sangue (choque)
- psicológico: por exemplo, em resposta a ameaças agudas ou crônicas

O estresse agudo, independentemente de sua origem, causa uma ativação da glicogenólise através da ação do hormônio catecolamínico epinefrina, liberado pela medula adrenal. Durante o exercício prolongado, o glucagon e a epinefrina contribuem para a estimulação da glicogenólise e para a manutenção da concentração sanguínea de glicose.

Concentrações sanguíneas aumentadas do hormônio esteroide adrenocortical cortisol também

induzem a glicogenólise. Os níveis do glicocorticoide cortisol variam diurnamente no plasma, mas podem estar cronicamente elevados sob condições continuamente estressantes, incluindo estresse fisiológico e ambiental (p. ex., o frio).

O glucagon serve como um modelo geral para o mecanismo de ação dos hormônios que agem pela via de receptores na superfície celular. O cortisol, que age ao nível de expressão gênica, será discutido mais adiante, nos Capítulos 34 e 39.

MECANISMO DE AÇÃO DO GLUCAGON

O glucagon se liga a um receptor na membrana plasmática hepática e inicia uma cascata de reações que levam à mobilização do glicogênio hepático (Fig. 13.4) durante o estado pós-absortivo. No lado interno da membrana plasmática existe uma classe de proteínas transdutoras de sinal, conhecidas como proteínas G, que se ligam ao trifosfato de guanosina (GTP) e ao difosfato de guanosina (GDP), nucleotídeos análogos ao ATP e ao ADP. O GDP está ligado no estado de repouso. A ligação do glucagon ao receptor da membrana plasmática estimula a troca de GDP por GTP na proteína G, e a proteína G passa por mudança conformacional que leva à dissociação de uma de suas subunidades, que então se liga e ativa a enzima da membrana plasmática adenilato ciclase. Essa enzima converte ATP citoplasmático em AMP 3′,5′-cíclico (cAMP), um mediador solúvel que é descrito como "segundo mensageiro" para a ação do glucagon (e outros hormônios). O cAMP se liga à enzima citoplasmática proteína cinase A (PKA), causando a dissociação das subunidades inibitórias (regulatórias) das subunidades catalíticas da enzima heterodimérica, diminuindo a inibição da PKA (Caps. 21 e 40), que então fosforila os resíduos de serina e treonina nas proteínas e enzimas-alvo.

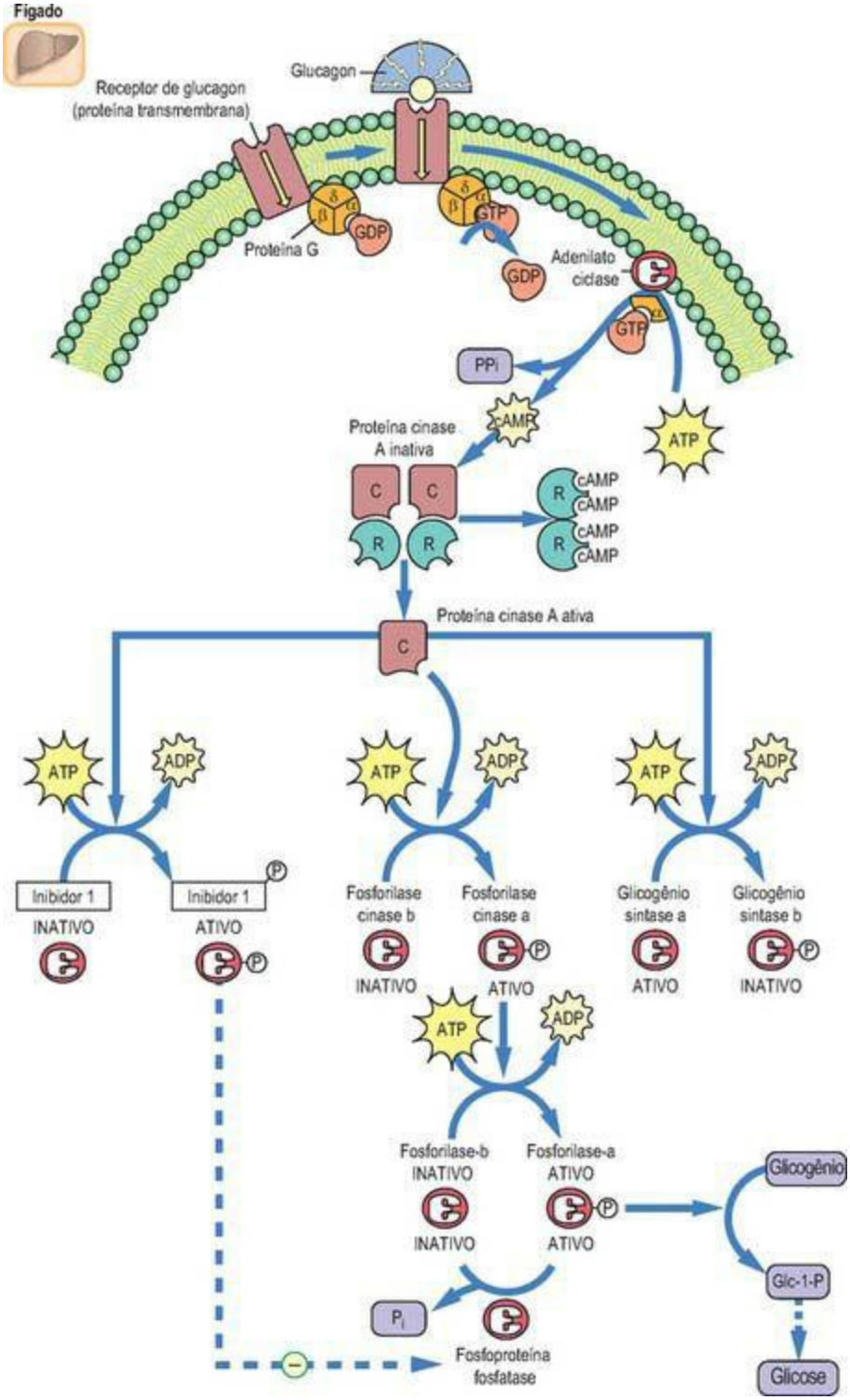


Fig. 13.4 Sistema de amplificação em cascata. Mobilização de glicogênio hepático pelo glucagon. A cascata de reações amplifica a resposta hepática à ligação do glucagon ao seu receptor na membrana plasmática. O cAMP é conhecido como o segundo mensageiro da ação do glucagon. A PKA ativa indiretamente a fosforilase via fosforilase cinase e inativa diretamente a glicogênio sintase. C, subunidades catalíticas; R, subunidades regulatórias (inibitórias); PKA, proteína cinase A (compare com a Figura 21.6).

PROTEÍNAS G

As proteínas G são proteínas da membrana plasmática, ligantes de nucleotídeo de guanosina que estão envolvidas na transdução de sinal para uma grande variedade de hormônios (Fig. 13.4; Cap. 40). Em alguns casos elas estimulam (Gs) e em outros casos elas inibem (Gi) as proteínas cinase e a fosforilação de proteínas. As proteínas G estão intimamente associadas com receptores de hormônios

nas membranas plasmáticas, e consistem em subunidades α, β e γ. A subunidade Gα liga GDP no estado de repouso. Após a ligação do hormônio, o receptor recruta as proteínas G, estimulando a troca de GDP por GTP na subunidade Gα. A ligação do GTP leva à liberação das subunidades β e γ e a subunidade α está então livre para se ligar e ativar a adenilato ciclase. A resposta hormonal é amplificada após a ligação ao receptor porque um único receptor pode ativar várias subunidades α. As respostas hormonais também são desligadas ao nível dos receptores e proteínas G por dois mecanismos:

- a subunidade Gα tem atividade lenta de trifosfato de guanosina fosfatase que hidrolisa GTP, com uma meia-vida medida em minutos, de modo que gradualmente se dissocia da adenilato ciclase e, assim, para de ativá-la
- a fosforilação do receptor de hormônio pela proteína cinase A reduz sua afinidade pelo hormônio, um processo descrito como dessensibilização ou resistência ao hormônio

A PROTEÍNA CINASE A É MUITO SENSÍVEL A PEQUENAS MUDANÇAS NA CONCENTRAÇÃO DE cAMP

Como ilustrado na Figura 13.4, a PKA dependente de cAMP é uma enzima tetramérica com dois tipos diferentes de subunidades (R_2C_2); a subunidade catalítica C tem atividade de proteína cinase e a subunidade regulatória R inibe essa atividade. A subunidade R tem uma sequência de aminoácidos que poderia normalmente ser reconhecida e fosforilada pela subunidade C, exceto pelo fato de que essa sequência em R contém uma alanina, em vez de um resíduo de serina ou treonina. A ligação de duas moléculas de cAMP a cada subunidade R resulta em mudanças conformacionais que levam à dissociação de um dímero (cAMP-R_2) das subunidades C. As subunidades C monoméricas ativas então começam a fosforilar os resíduos de serina e treonina nas enzimas-alvo. A PKA não é uma enzima alostérica típica, em que a ligação de um efetor alostérico (cAMP) causa dissociação das subunidades; entretanto, a ativação completa da PKA envolve a ligação cooperativa de quatro moléculas de cAMP a duas subunidades R. A PKA é totalmente ativada em concentrações submicromolares de cAMP, de modo que ela é refinadamente sensível a pequenas mudanças na atividade da adenilato ciclase em resposta ao glucagon.

A via para a ativação da glicogênio fosforilase (Fig. 13.4) envolve a fosforilação de muitas moléculas de fosforilase cinase pela PKA, que então fosforila e ativa muitas moléculas de glicogênio fosforilase. O efeito global dessas etapas sequenciais, começando com a ativação de muitas moléculas de adenilato ciclase pelas proteínas G, é um sistema de "amplificação em cascata", não diferente de uma série de amplificadores em um rádio ou em um aparelho de som, resultando em aumento maciço na extensão do sinal dentro de segundos após a ligação do glucagon à membrana plasmática do hepatócito. A fosforilação da fosforilase ativa a glicogenólise, levando à produção de Glc-6-P no fígado, que é então hidrolisada a glicose e exportada para o sangue. Outro alvo da PKA é o inibidor 1, uma proteína inibidora da proteína fosfatase, que é ativado pela fosforilação. O inibidor 1 fosforilado inibe as fosfoproteínas fosfatases citoplasmáticas, que poderiam, de outro modo, reverter a fosforilação das enzimas e reprimir a resposta ao glucagon (Fig. 13.4).

A glicogenólise e a glicogênese são vias opostas. Teoricamente, a Glc-1-P produzida pela fosforilase poderia ser rapidamente ativada à UDP-glicose e reincorporada ao glicogênio. Para

prevenir esse desperdício ou *ciclo fútil*, a PKA também age diretamente na glicogênio sintase, nesse caso inativando a enzima. Então, a ativação da fosforilase (glicogenólise) é coordenada com a inativação da glicogênio sintase (glicogênese). Outras vias biossintéticas hepáticas, incluindo a síntese de proteínas, colesterol, ácidos graxos e triglicerídeos, assim como a glicólise, também são reguladas pela fosforilação de enzimas regulatórias chave, focando o metabolismo hepático em resposta ao glucagon na provisão de glicose para o sangue para a manutenção das funções corporais vitais (Cap. 21).

Talvez para equilibrar o balanço da cascata de eventos que amplificam a resposta ao glucagon existam mecanismos múltiplos e redundantes para garantir a rápida terminação da resposta hormonal (Tabela 13.3). Em adição à lenta atividade de GTPase da subunidade Gα, também existe uma atividade fosfodiesterase na célula que hidrolisa cAMP a AMP, permitindo a reassociação das subunidades inibitória e catalítica da PKA, reduzindo sua atividade de proteína cinase. Também existem fosfoproteínas fosfatases que removem os grupos fosfatos das formas ativas e fosforiladas da fosforilase cinase e da fosforilase. A redução na concentração de cAMP e na atividade PKA também leva à redução na fosforilação do inibidor 1, permitindo atividade aumentada das fosfoproteínas fosfatases. Assim, uma série de mecanismos age em conjunto para garantir que a glicogenólise hepática diminua rapidamente em resposta ao aumento na glicose sanguínea e à diminuição das concentrações sanguíneas de glucagon após a refeição.

Tabela 13.3 Vários mecanismos estão envolvidos na terminação da resposta hormonal ao glucagon.

Mecanismos de terminação da resposta hormonal ao glucagon
Hidrólise de GTP na subunidade G_α
Hidrólise do cAMP pela fosfodiesterase
Atividade da proteína fosfatase

Existem várias doenças genéticas autossômicas recessivas afetando o metabolismo do glicogênio (Tabela 13.4). Essas doenças, conhecidas como doenças do armazenamento do glicogênio, são caracterizadas pelo acúmulo de grânulos de glicogênio nos tecidos, que eventualmente comprometem suas funções. Prognosticamente, as doenças de armazenamento do glicogênio que afetam o metabolismo hepático do glicogênio são caracterizadas por hipoglicemia no jejum e podem ser fatais, enquanto os defeitos no metabolismo do glicogênio nos músculos são caracterizados por fadiga muscular rápida durante o exercício.

Tabela 13.4 Principais classes de doenças de armazenamento de glicogênio.

Tipo	Nome	Deficiência enzimática	Consequências estruturais ou clínicas
I	von Gierke	Glc-6-Pase	hipoglicemia pós-absortiva severa, acidemia lática, hiperlipidemia
II	Pompe	α-glicosidade lisossomal	grânulos de glicogênio nos lisossomas
III	Cori	enzima desramificadora	estrutura alterada do glicogênio, hipoglicemia
IV	Andersen	enzima ramificadora	estrutura do glicogênio alterada
V	McArdle	fosforilase muscular	deposição excessiva de glicogênio no músculo, câimbras e fadiga induzidas pelo exercício
VI	Hers	fosforilase hepática	hipoglicemia, não tão severa como no tipo I

MOBILIZAÇÃO DO GLICOGÊNIO HEPÁTICO PELA EPINEFRINA

A epinefrina trabalha através de vários receptores diferentes em diferentes células. Os receptores mais bem estudados são os receptores α e β-adrenérgicos; eles reconhecem diferentes características da molécula de epinefrina, ligam-se à epinefrina com diferentes afinidades, trabalham por diferentes mecanismos e são inibidos por diferentes classes de fármacos. Durante a hipoglicemia severa, o glucagon e a epinefrina trabalham juntos para ampliar a resposta glicogenolítica no fígado. Entretanto, mesmo quando a glicose sanguínea está normal, a epinefrina é liberada em resposta às ameaças reais ou percebidas, causando aumento na glicose sanguínea para garantir a resposta de luta ou fuga. A cafeína do café e a teofilina do chá são inibidores da fosfodiesterase e também causam aumento no cAMP hepático e na glicose sanguínea. Assim como a epinefrina, a cafeína, administrada na forma de poucas xícaras de café forte, também pode nos tornar alertas, responsivos e agressivos.

A ação da epinefrina sobre a glicogenólise hepática procede por duas vias. Uma delas, através do receptor β-adrenérgico da epinefrina, é similar àquela do glucagon, envolvendo um receptor específico para epinefrina na membrana plasmática, proteínas G e cAMP. A resposta à epinefrina aumenta os efeitos do glucagon durante a hipoglicemia severa (estresse metabólico) e também explica, em parte, a taquicardia, o suor, os tremores e a ansiedade associados com a hipoglicemia. A epinefrina também trabalha simultaneamente através do receptor α, mas por um mecanismo diferente. A ligação aos receptores α também envolve proteínas G, elementos comuns na transdução do sinal de hormônios mas, nesse caso, a proteína G é especifica para a ativação de uma isoenzima específica de membrana da fosfolipase C (PLC), que é específica para a quebra de um fosfolipídio de membrana, o fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) (Fig. 13.5). Ambos os produtos da ação da PLC, diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3), agem como segundos mensageiros da ação da epinefrina. O DAG ativa a proteína cinase C (PKC) que, assim como a PKA, inicia a fosforilação dos resíduos de serina e de treonina nas proteínas-alvo. O IP_3 promove o transporte de Ca^{2+} para o citosol. O Ca^{2+} então se liga à proteína citoplasmática calmodulina, que se liga e ativa a fosforilase cinase, levando à fosforilação independente de cAMP e ativação da fosforilase. A proteína cinase dependente de Ca^{2+}-calmodulina e outras enzimas também são ativadas, pela fosforilação ou pela associação com o complexo Ca^{2+}-calmodulina. Portanto, uma série de vias metabólicas é ativada em resposta ao estresse, especialmente aquelas envolvidas na mobilização das reservas energéticas.

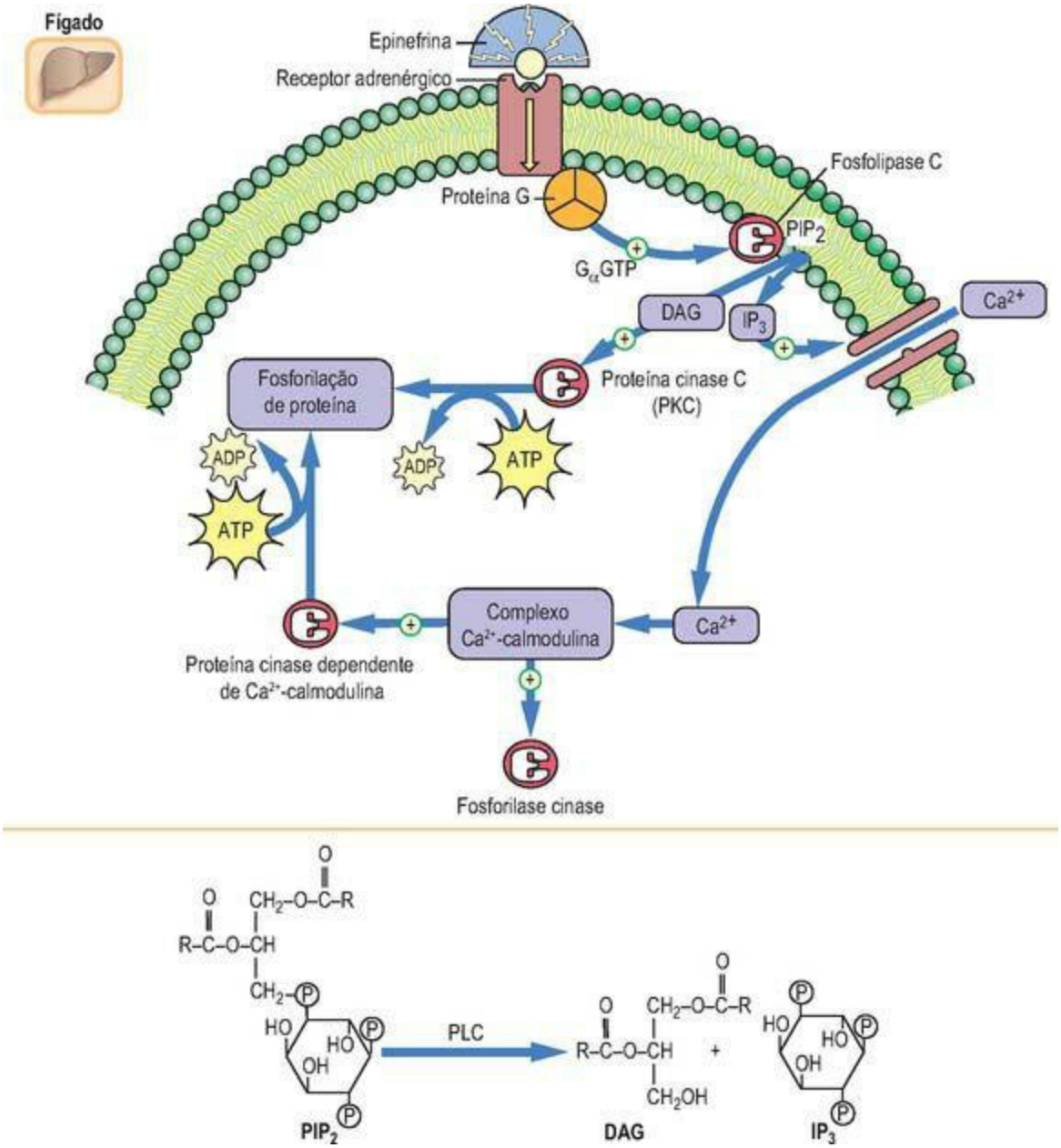


Fig. 13.5 Mecanismo de ativação da glicogenólise no fígado via receptor α-adrenérgico. O diacilglicerol (DAG) e o inositol trifosfato (IP_3) são segundos mensageiros que medeiam a resposta adrenérgica. Tanto o DAG quanto a PKC permanecem associados com a membrana plasmática. PIP_2, fosfatidilinositol bifosfato; PKC, proteína cinase C. Ver também as Figuras 13.8 e 13.9 e o capítulo 40.

DOENÇA DE McARDLE: UMA DOENÇA DE ARMAZENAMENTO DO GLICOGÊNIO QUE REDUZ A CAPACIDADE PARA O EXERCÍCIO

Um homem de 30 anos de idade consultou seu médico por causa de dores musculares crônicas nos braços e pernas e câimbras durante o exercício. Ele indicou que sempre teve alguma fraqueza muscular e, por essa razão, nunca fora ativo em esportes escolares, mas o problema não se tornou sério até que recentemente se matriculou em um programa de exercícios para melhorar sua saúde. Ele também notou que a dor geralmente desaparecia após cerca de 15-30 minutos, quando então podia continuar com seu exercício sem desconforto. Sua concentração de glicose sanguínea estava normal durante o exercício, mas a creatina cinase sérica (isoforma MM para o músculo esquelético) estava elevada, sugerindo dano muscular. A glicose no sangue diminuiu ligeiramente durante 15 minutos de

exercício, mas inesperadamente o lactato sanguíneo também diminuiu, em vez de aumentar, mesmo quando estava sentindo câimbras musculares. Uma biópsia indicou um nível anormalmente alto de glicogênio no músculo, sugerindo doença de armazenamento de glicogênio.

Comentário: Esse paciente sofre da doença de MacArdle, uma rara deficiência na atividade da fosforilase muscular. A deficiência real na enzima tem de ser confirmada por ensaio enzimático, já que várias outras mutações também poderiam afetar o metabolismo do glicogênio muscular. Durante os períodos iniciais de exercício intenso, o músculo obtém a maior parte de sua energia através do metabolismo da glicose, derivada do glicogênio. Durante as câimbras, que normalmente ocorrem durante débito de oxigênio, a maioria do piruvato produzido pela glicólise é excretada no sangue como lactato, levando a aumento na concentração de lactato no sangue. Nesse caso, entretanto, o paciente teve câimbras mas não excretou lactato, sugerindo uma falha em mobilizar o glicogênio muscular para produzir a glicose. Sua recuperação após 15-30 minutos resulta de ativação mediada por epinefrina da glicogenólise hepática, que fornece glicose ao sangue para aliviar o déficit na glicogenólise muscular. O tratamento da doença de MacArdle usualmente envolve evitar o exercício ou o consumo de carboidratos antes do exercício. Do contrário, o curso da doença será inevitável.

CRIANÇA NASCIDA DE MÃE MALNUTRIDA PODE TER HIPOGLICEMIA

Uma bebê nasceu após 39 semanas de gestação de mãe jovem malnutrida. A criança também era magra e fraca ao nascimento e, dentro de 1 hora após o parto, mostrava sinais de sofrimento, incluindo batimentos cardíacos e respiração rápidos. Sua glicose sanguínea era de 3,5 mmol/L (63 mg/dL) ao nascimento e declinou rapidamente para 1,5 mmol/L (27 mg/dL) após 1 h, quando ela se tornou irresponsiva e comatosa. Sua condição foi marcadamente melhorada pela infusão de uma solução de glicose, seguida por dieta rica em carboidrato. Ela melhorou gradualmente ao longo das duas semanas seguintes antes de ter alta do hospital.

Comentário. Durante o desenvolvimento no útero, o feto obtém glicose exogenamente, através da circulação placentária. Entretanto, após o nascimento, a criança conta com a mobilização do glicogênio hepático e em seguida com a gliconeogênese para a manutenção da glicose sanguínea. Devido ao estado de subnutrição da mãe, a criança nasceu com reservas hepáticas de glicogênio insignificantes. Assim, ela era incapaz de manter a homeostasia da glicose sanguínea no pós-parto e rapidamente entrou em hipoglicemia, iniciando uma resposta ao estresse. Após sobreviver à hipoglicemia transiente, ela provavelmente ainda tinha falta de massa muscular adequada para fornecer um suprimento suficiente de aminoácidos para a gliconeogênese. A infusão de glicose, seguida por dieta rica em carboidratos, iria suplementar esses déficits, mas poderia não corrigir danos mais sérios devidos à má nutrição prolongada durante o desenvolvimento fetal.

CRIANÇA GRANDE NASCIDA DE MÃE DIABÉTICA

Um menino, nascido de mãe cronicamente hiperglicêmica e fracamente controlada, era grande e gordo (macrossômico) ao nascimento (5 kg), mas parecia normal. Ele enfraqueceu rapidamente, entretanto, e dentro de 1 hora mostrou todos os sintomas de hipoglicemia, similar ao caso do bebê

nascido de mãe malnutrida. A diferença, nesse caso, era que o menino estava obviamente pesado, em vez de pequeno e malnutrido.

Comentário. Essa criança experimentou um ambiente cronicamente hiperglicêmico durante o desenvolvimento uterino. Ela se adaptou através do aumento da produção de insulina endógena, que apresenta uma atividade semelhante ao hormônio do crescimento, resultando em macrossomia. Ao nascimento, quando o aporte placentário de glicose cessou, apresentava concentração normal de glicose sanguínea e substancial provisão de glicogênio hepático. Entretanto, a hiperinsulinemia crônica anterior ao nascimento provavelmente reprimiu as enzimas gliconeogênicas, e sua alta concentração sanguínea de insulina ao nascimento promoveu uma captação de glicose pelos músculos e pelo tecido adiposo. Na ausência de fonte materna de glicose, a hipoglicemia induzida pela insulina levou a uma resposta de estresse, que foi corrigida pela infusão de glicose. Após 1-2 dias, sua ampla massa corporal irá fornecer um bom reservatório para a síntese de glicose sanguínea a partir de proteína muscular.

GLICOGENÓLISE NO MÚSCULO

A localização tecidual dos receptores hormonais fornece especificidade tecidual para a ação dos hormônios. Assim, somente aqueles tecidos com receptores para glucagon respondem a esse hormônio. O músculo pode ser rico em glicogênio, mesmo durante a hipoglicemia, mas não tem os receptores de glucagon nem Glc-6-Pase. Por esse motivo, o glicogênio muscular não pode ser mobilizado para reabastecer a glicose sanguínea. A glicogenólise muscular é ativada em resposta à epinefrina através do receptor β-adrenérgico cAMP-dependente, mas a glicose é metabolizada através da glicólise para a produção de energia. Isso ocorre não somente durante as situações de luta ou fuga, mas também em resposta às demandas metabólicas durante o exercício prolongado. Existem dois importantes mecanismos independentes de hormônio para a ativação da glicogenólise no músculo (Fig. 13.6). Primeiro, o influxo de Ca^{2+} para o citoplasma do músculo em resposta à estimulação do nervo ativa a forma basal não fosforilada da fosforilase cinase pela ação do complexo Ca^{2+}-calmodulina. Essa ativação independente de hormônio da fosforilase proporciona a rápida ativação da glicogenólise durante explosões curtas de exercício, mesmo na ausência da ação da epinefrina. O segundo mecanismo para a ativação da glicogenólise muscular envolve a ativação alostérica direta da fosforilase pelo AMP. O uso aumentado do ATP durante uma rápida explosão de atividade muscular leva ao rápido acúmulo de ADP, que é convertido em parte a AMP pela ação da enzima miocinase (adenilato cinase), que catalisa a reação:

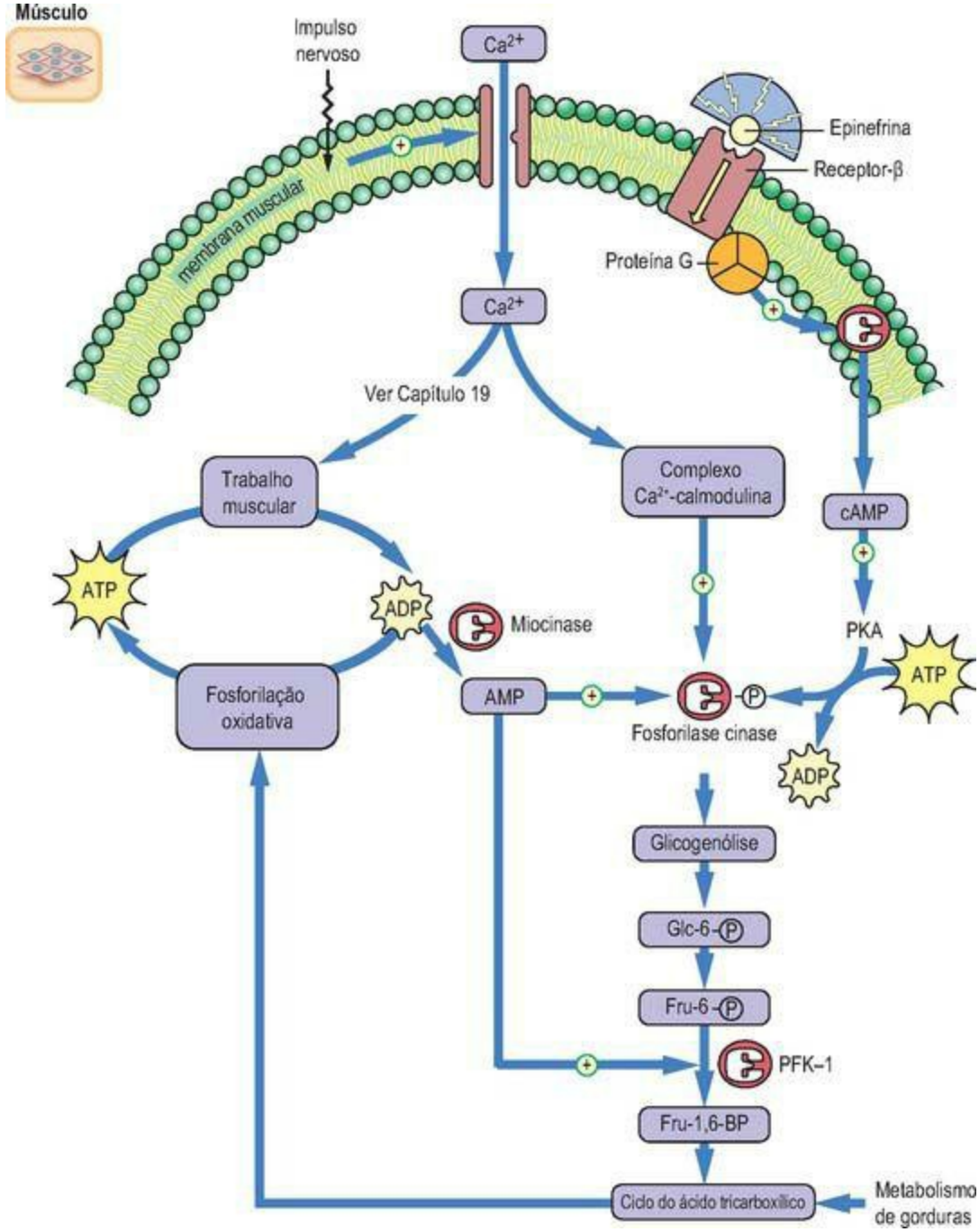


Fig. 13.6 Regulação da proteína cinase A no músculo. Ativação da glicogenólise e da glicólise no músculo durante o exercício. PFK-1, fosfofrutocinase-1. Compare com a Figura 8.4.

$$2\ ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$$

A INIBIÇÃO MÁXIMA DA GLICOGÊNIO SINTASE É ALCANÇADA SOMENTE ATRAVÉS DE AÇÃO SEQUENCIAL DE VÁRIAS CINASES

Quando o glucagon e a epinefrina estão agindo no fígado, a ativação da glicogenólise e a inibição da glicogênese são mediadas por pelo menos três cinases: a proteína cinase A (PKA), a proteína cinase C (PKC) e a proteína cinase ativada por Ca^{2+}-calmodulina. Todas essas três proteínas cinases fosforilam resíduos-chave de serina e treonina nas enzimas regulatórias. Essas e outras proteínas cinases trabalham juntas umas com as outras em um processo conhecido como fosforilação

sequencial ou hierárquica, levando à fosforilação de até nove resíduos de aminoácidos na glicogênio sintase. A inibição máxima da glicogênio sintase é alcançada somente através da atividade sequencial de várias cinases. Em alguns casos, certos resíduos de serina ou treonina têm de ser fosforilados em uma sequência específica pela ação cooperativa de diferentes cinases; por exemplo, a fosforilação de um sítio por uma enzima requer a fosforilação anterior de outro sítio por uma outra enzima.

O AMP ativa as formas basal e fosforilada da fosforilase, aumentando a glicogenólise na presença ou na ausência de estimulação hormonal. O AMP também atenua a inibição da fosfofrutocinase-1 (PFK-1) pelo ATP (Cap. 12), estimulando a utilização de glicose através da glicólise para a produção de energia. Os efeitos estimulatórios do Ca^{2+} e do AMP garantem que o músculo possa responder às suas necessidades energéticas, mesmo na ausência de estímulo hormonal.

REGULAÇÃO DA GLICOGÊNESE

A glicogênese (e o armazenamento de energia em geral) ocorre durante e imediatamente após as refeições. A glicose e outros carboidratos que chegam ao fígado a partir do intestino via circulação porta são eficientemente capturados para a síntese de glicogênio. O excesso de glicose continua na circulação periférica, de onde a glicose é absorvida para o músculo e tecido adiposo para as reservas de energia ou armazenamento. Normalmente comemos sentados, em vez de durante o exercício, de modo que vias opostas de captação e armazenamento *versus* as de mobilização e utilização de abastecimento energético são funções temporariamente compartimentalizadas em nossa vida.

O armazenamento de energia está sob controle do hormônio polipeptídico insulina, que é produzido nas células β das ilhotas pancreáticas de Langerhans (Cap. 21). A insulina é secretada no sangue após uma refeição, monitorando a concentração sanguínea de glicose. Ela tem duas funções primárias no metabolismo dos carboidratos: primeiro, reverte as ações do glucagon na fosforilação de proteínas, desligando a glicogênio fosforilase e ativando a glicogênio sintase, promovendo o armazenamento de glicose; segundo, estimula a captação de glicose pelos tecidos periféricos (músculo e tecido adiposo), facilitando a síntese e o armazenamento de glicogênio e triglicerídeos. A insulina também age no nível da expressão gênica, estimulando a síntese de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos e no armazenamento e conversão de glicose em triglicerídeos.

A fosforilação em tirosinas de proteínas, em vez da fosforilação em serinas e treoninas, é um aspecto característico da insulina e da atividade do fator de crescimento. A ligação da insulina ao seu receptor transmembrana (Fig. 13.7) estimula a agregação dos receptores e promove a atividade de tirosina cinase no domínio intracelular do receptor. O receptor de insulina autofosforila seus resíduos de tirosina, aumentando sua atividade da proteína tirosina cinase e fosforila os resíduos de tirosina em outras proteínas intracelulares efetoras, que então ativam vias secundárias. Dentre elas estão cinases que fosforilam resíduos de serina e treonina nas proteínas, mas em sítios e em proteínas diferentes daqueles fosforilados pela PKA e pela PKC. A ativação dependente de insulina da GTPase, da fosfodiesterase e das fosfoproteínas fosfatases também detém a ação do glucagon, que está tipicamente presente em altas concentrações no sangue nas horas das refeições, isto é, várias horas desde a última refeição.

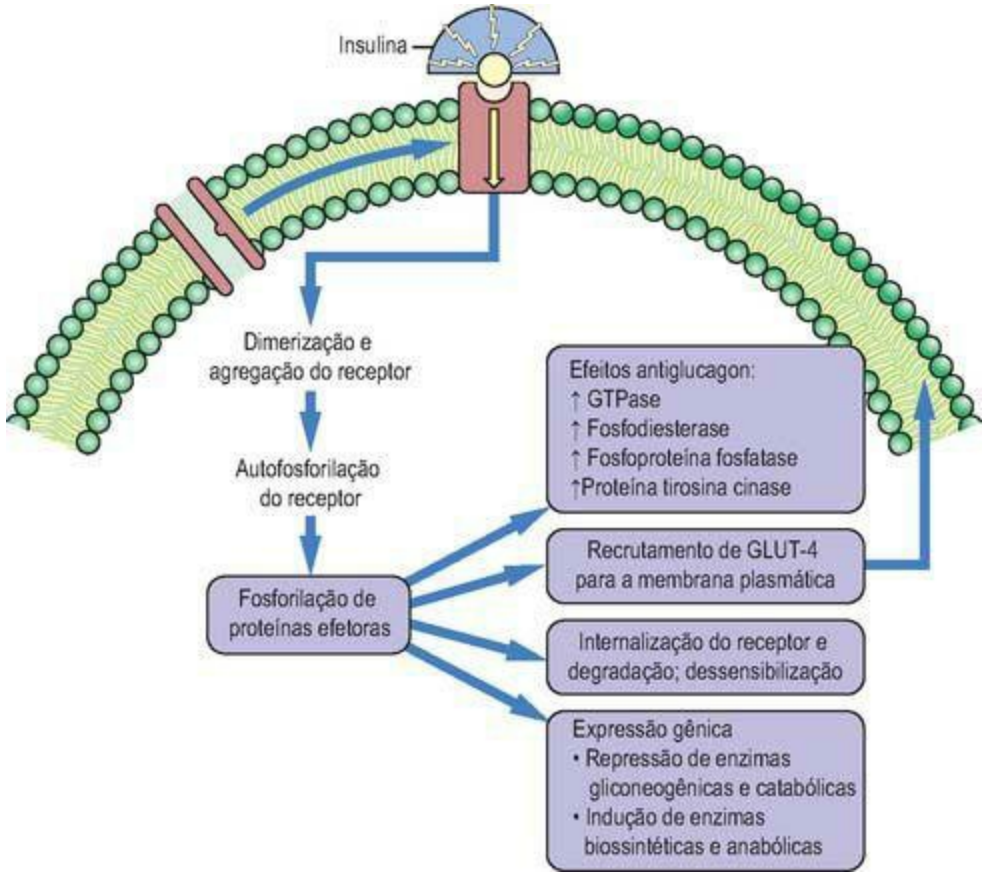


Fig. 13.7 Mecanismos de ação da insulina. Efeitos regulatórios da insulina no metabolismo hepático e muscular de carboidratos (Cap. 21).

O fígado também parece ser diretamente responsivo à concentração sanguínea de glicose ambiente, uma vez que a síntese de glicogênio hepático aumenta após a refeição, mesmo na ausência de estímulo hormonal. Assim, o aumento na glicogênese hepática se inicia mais rapidamente do que o aumento na concentração de insulina no sangue. A perfusão do fígado com soluções de glicose *in vitro*, na ausência de insulina, também leva à inibição da glicogenólise e à ativação da glicogênese. Isso parece ocorrer pela inibição alostérica direta da fosforilase pela glicose e estimulação secundária da atividade de proteína fosfatase.

A maioria, se não todas, as células no corpo são responsivas à insulina de alguma maneira, mas os principais locais de ação da insulina, levando-se em conta a massa, são o músculo e o tecido adiposo. Esses tecidos normalmente têm baixos níveis de transportadores de glicose na superfície celular, restringindo a entrada de glicose — eles contam principalmente com os lipídeos para o metabolismo energético. No músculo e no tecido adiposo, a atividade de tirosina cinase do receptor da insulina induz o movimento do transportador 4 de glicose (GLUT-4; Tabela 8.2) a partir dos vacúolos intracelulares para a superfície celular, aumentando o transporte de glicose para dentro da célula. A glicose é então usada no músculo para a síntese de glicogênio e no tecido adiposo para produzir gliceraldeído-3-fosfato, que é convertido a glicerol-3-fosfato para a síntese de triglicerídeos (Cap. 16). A absorção de glicose pelo músculo e pelo tecido adiposo mediada por GLUT-4 e estimulada pela insulina é o mecanismo primário que limita o aumento da glicose sanguínea após uma refeição.

GLICONEOGÊNESE

Durante o jejum e a inanição, quando o glicogênio hepático é esgotado, a gliconeogênese é essencial para a manutenção da homeostasia da glicose sanguínea. Diferentemente da glicogenólise, que pode ser rapidamente ativada em resposta à estimulação hormonal, a gliconeogênese aumenta mais lentamente, dependendo das mudanças na expressão de genes, e alcança atividade máxima após um período de horas (Fig. 13.1); ela se torna a fonte primária de nossa concentração sanguínea de glicose cerca de oito horas no estado pós-absortivo (Cap. 21). A gliconeogênese necessita de uma fonte de energia para a biossíntese e uma fonte de carbono para a formação do esqueleto da molécula de glicose. Essa energia é fornecida pelo metabolismo de ácidos graxos liberados do tecido adiposo. Os esqueletos de carbono são fornecidos por três fontes primárias:

- lactato produzido em tecidos como as células vermelhas e o músculo
- aminoácidos derivados de proteínas musculares
- glicerol liberado de triglicerídeos durante a lipólise no tecido adiposo

Entre estes, a proteína muscular é o principal precursor da glicose sanguínea — a velocidade da gliconeogênese frequentemente é limitada pela disponibilidade de substrato, incluindo a velocidade de proteólise no músculo ou, em alguns casos, da massa muscular. Durante o jejum prolongado, a má nutrição ou a inanição, perdemos massa adiposa e muscular. A gordura é usada tanto para as necessidades energéticas gerais do corpo quanto para o sustento da gliconeogênese, enquanto a maioria dos aminoácidos nas proteínas é convertida em glicose.

Gliconeogênese a partir do lactato

A gliconeogênese é conceitualmente o oposto da glicólise anaeróbica, mas segue por uma via ligeiramente diferente, envolvendo enzimas mitocondriais e citosólicas (Fig. 13.8). Durante a gliconeogênese hepática, o lactato é convertido em glicose, usando, em parte, as mesmas enzimas glicolíticas envolvidas na conversão de glicose em lactato. O ciclo do lactato, que envolve o fígado, as células vermelhas e o músculo, conhecido como ciclo de Cori, é discutido em detalhes no capítulo 21. Neste ponto, discutiremos a via metabólica para a conversão de lactato em glicose.

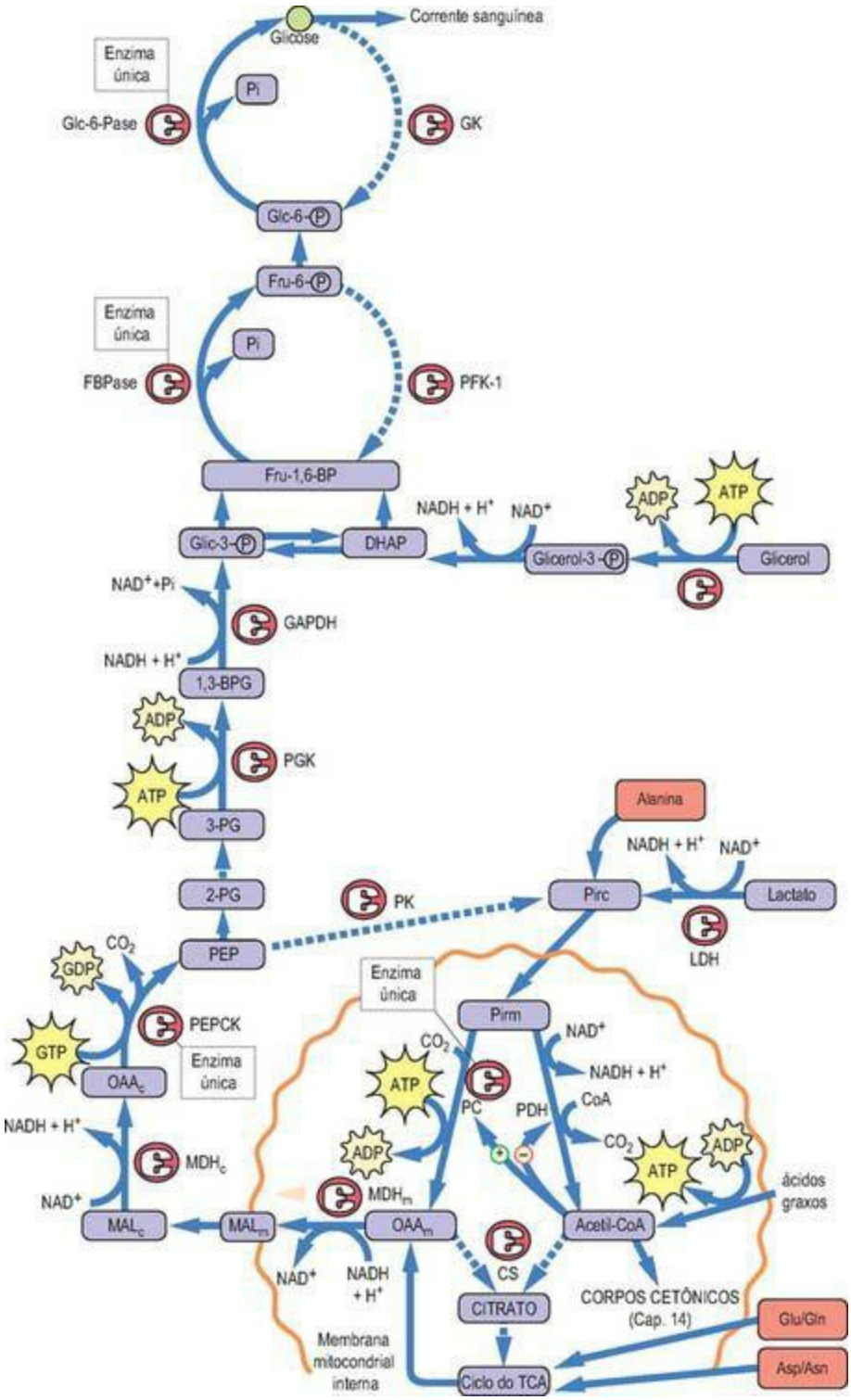


Fig. 13.8 Via da gliconeogênese. A gliconeogênese é o reverso da glicólise. Enzimas únicas superam as reações irreversíveis das cinases da glicólise. **Compartimentos**: c, meio citoplasmático; imm, membrana mitocondrial interna; m, mitocôndria. **Enzimas**: CS,

citrato sintase; Fru-1,6-BPase, frutose 1,6-bifosfatase; GAPDH, gliceraldeído 3-P desidrogenase; Glc-6-Pase, glicose 6-fosfatase; GK, glicocinase; MDH, malato desidrogenase; PC, piruvato carboxilase; PDH, piruvato desidrogenase; PGK, fosfoglicerato cinase. **Substratos**: 2,3-BPG, bifosfoglicerato; DHAP, di-hidroxiacetona fosfato; Fru-1,6-BP, frutose-1,6-bifosfato; Glic-3-P, gliceraldeído 3-fosfato; MAL, malato; OAA, oxaloacetato; PEP, fosfoenolpiruvato; PEPCK, PEP carboxicinase; Pir, piruvato; 3-PG, 3-fosfoglicerato. *Linhas sólidas:* ativo durante a gliconeogênese. *Linhas pontilhadas:* inativo durante a gliconeogênese.

O problema crítico na reversão da glicólise é a superação da irreversibilidade de três reações de cinases: glicocinase (GK), fosfofrutocinase-1 (PFK-1) e piruvato cinase (PK). A quarta cinase na glicólise, a fosfoglicerato cinase (PGK) catalisa uma reação de equilíbrio livremente reversível: uma reação de fosforilação em nível de substrato, transferindo um acil fosfato de alta energia no 1,3-bifosfoglicerato para uma ligação pirofosfato energeticamente similar no ATP. Para contornar as três reações irreversíveis, o fígado usa quatro enzimas: a piruvato carboxilase (PC) na mitocôndria e a fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) no citoplasma para desviar da reação da PK, a frutose-1,6-bifosfatase (Fru-1,6-BPase) para desviar da reação da PFK-1 e a Glc-6-Pase para desviar da reação da GK (Fig. 13.8). A gliconeogênese a partir do lactato envolve, primeiro, sua conversão em fosfoenolpiruvato (PEP), um processo que necessita de investimento de dois equivalentes de ATP devido à alta energia da ligação enol-fosfato no PEP. O lactato é primeiro convertido em piruvato pela lactato desidrogenase (LDH), que então entra na mitocôndria, onde é convertido a oxaloacetato pela PC, usando a biotina e o ATP. O oxaloacetato é reduzido a malato pela malato desidrogenase do ciclo TCA, sai da mitocôndria e é então reoxidado a oxaloacetato pela malato desidrogenase citosólica. O oxaloacetato citosólico é então descarboxilado pela PEPCK, usando GTP como cossubstrato, produzindo PEP. A energia para a síntese de PEP a partir do oxaloacetato é derivada do GTP e da descarboxilação do oxaloacetato.

A glicólise pode agora prosseguir ao contrário a partir do PEP até que alcance a próxima reação irreversível, a catalisada pela PFK-1. Essa enzima é contornada por uma reação de hidrólise simples, catalisada pela Fru-1,6-BPase sem produção de ATP, revertendo a reação da PFK-1 e produzindo Fru-6-P. De modo similar, o desvio da GK é acompanhado pela hidrólise da Glc-6-P pela Glc-6-Pase, sem produção de ATP. A glicose livre é então liberada para o sangue.

A gliconeogênese é relativamente eficiente — o fígado pode produzir um quilo de glicose por dia através da gliconeogênese e, de fato o faz, em pacientes diabéticos hiperglicêmicos e fracamente controlados. A produção normal de glicose, na ausência de carboidrato na dieta, é ~200 g/dia. A gliconeogênese a partir do piruvato é moderadamente dispendiosa, necessitando de um gasto equivalente a 4 moles de ATP por mol de piruvato convertido em glicose, isto é, 2 moles de ATP na reação da PC e 2 moles de GTP na reação da PEPCK. Esse ATP é fornecido pela oxidação de ácidos graxos (Cap. 15).

Gliconeogênese a partir de aminoácidos e glicerol

A maioria dos aminoácidos é glicogênica, isto é, após desaminação, seus esqueletos de carbono podem ser convertidos em glicose. A alanina e a glutamina são os principais aminoácidos exportados do músculo para a gliconeogênese. Suas concentrações relativas no sangue venoso proveniente do músculo excedem suas concentrações relativas nas proteínas musculares, indicando considerável remanejamento dos aminoácidos musculares para o fornecimento de substratos glicogênicos. Como discutido em mais detalhes no capítulo 19, a alanina é convertida diretamente em piruvato pela enzima alanina aminotransferase (alanina transaminase, ALT), e então a gliconeogênese procede como descrito para o lactato. Outros aminoácidos são convertidos em intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo do TCA), e então em malato para a gliconeogênese. O aspartato, por exemplo, é convertido em oxaloacetato pela aspartato aminotransferase (aspartato transaminase, AST), e o glutamato em α-cetoglutarato pela glutamato desidrogenase. Alguns aminoácidos glicogênicos são convertidos por vias menos diretas em alanina ou em intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico para a gliconeogênese. Os aminogrupos desses aminoácidos são convertidos em ureia, via o ciclo da ureia nos hepatócitos, e a ureia é excretada na urina (Cap. 19).

O glicerol entra na gliconeogênese no nível das trioses fosfato (Fig. 13.8). Após a liberação de glicerol e dos ácidos graxos a partir do tecido adiposo no plasma, o glicerol capturado pelo fígado é fosforilado pela glicerol cinase, e então entra na via gliconeogênica como di-hidroxiacetona fosfato. Somente o componente glicerol das gorduras pode ser convertido em glicose. A incorporação do glicerol em glicose necessita somente de 2 moles de ATP por mol de glicose produzida.

A glicose não pode ser sintetizada a partir de ácidos graxos

Como discutido no capítulo 15, o metabolismo de ácidos graxos envolve sua conversão em dois passos de oxidação de carbono para formar a acetil-CoA, que então é metabolizada no ciclo do ácido tricarboxílico após a condensação com o oxaloacetato para formar citrato. Enquanto os carbonos do acetato são teoricamente disponíveis para a gliconeogênese pela conversão em malato, durante a via de citrato a malato, duas moléculas de CO_2 são eliminadas nas reações da isocitrato e da α-cetoglutarato desidrogenase. Portanto, embora seja produzida energia no ciclo do ácido tricarboxílico, os dois carbonos investidos para a gliconeogênese a partir da acetil-CoA são perdidos como CO_2. Por essa razão, a acetil-CoA, e portanto os ácidos graxos com número par de átomos de carbono, não pode servir como substrato para a gliconeogênese. Entretanto, os ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono e os ácidos graxos com cadeias ramificadas, que formam propionil-CoA, podem servir como precursores secundários para a gliconeogênese. A propionil-CoA é primeiro carboxilada a metilmalonil-CoA, que sofre reações de racemase e de mutase para formar a succinil-CoA, um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico (Cap. 15). A succinil-CoA é convertida em malato, sai da mitocôndria, e é oxidada a oxaloacetato. Após a descarboxilação pela PEPCK, os três carbonos do propionato são conservados no PEP e na glicose.

Regulação da gliconeogênese

Assim como o metabolismo do glicogênio no fígado, a gliconeogênese é primariamente regulada por mecanismos hormonais. Nesse caso, o processo regulatório envolve uma contrarregulação da glicólise e da gliconeogênese, largamente pela fosforilação/desfosforilação de enzimas, sob controle do glucagon e da insulina. O ponto de controle primário é nas enzimas regulatórias PFK-1 e Fru-1,6-BPase que, no fígado, são extraordinariamente sensíveis ao efetor alostérico frutose 2,6-bifosfato (Fru-2,6-BP). A Fru-2,6-BP é um ativador da PFK-1 e um inibidor da Fru-1,6-BPase, contrarregulando as duas vias opostas. Como mostrado na Figura 13.9, a Fru-2,6-BP é sintetizada por uma enzima incomum, bifuncional, a fosfofrutocinase-2/frutose-2, 6-bifosfatase (PFK-2/Fru-2,6-BPase), que tem atividades de cinase e de fosfatase. No estado fosforilado, efetuado pelo glucagon através da proteína cinase A, essa enzima mostra atividade de Fru-2,6-BPase, que reduz o nível de Fru-2,6-BP. A redução na Fru-2,6-BP diminui simultaneamente a estimulação da glicólise pela PFK-1 e abranda a inibição da gliconeogênese pela Fru-1,6-BPase. Dessa maneira, a fosforilação mediada pelo glucagon da PFK-2/Fru-2,6-BP coloca o fígado em um modo gliconeogênico. O aumento coordenado, alostericamente mediado, na Fru-1,6-BPase e a diminuição na atividade da PFK-1 assegura que a glicose produzida pela gliconeogênese não seja consumida pela glicólise em um ciclo fútil, mas liberada na circulação pela Glc-6-Pase. Similarmente, qualquer fluxo de glicose a partir do glicogênio através da glicogenólise, também induzido pelo glucagon, é desviado para o sangue, em vez de para a glicólise, pela inibição da PFK-1. A PK também é inibida pela fosforilação pela proteína cinase A (PKA), fornecendo um sítio adicional para a inibição da glicólise.

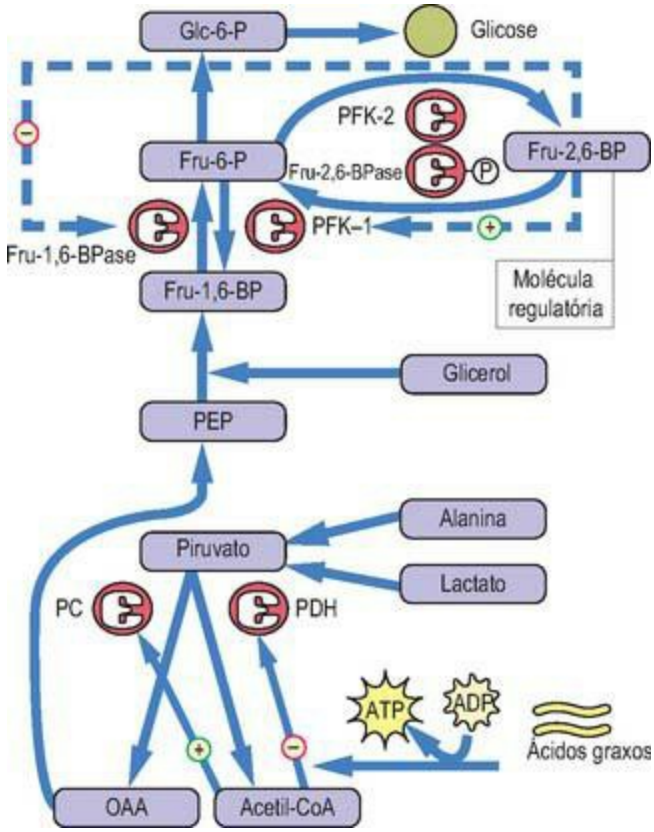


Fig. 13.9 Regulação da gliconeogênese. A gliconeogênese é regulada pelos níveis hepáticos de Fru-2,6-BP e de acetil-CoA. A parte superior do diagrama foca a regulação recíproca da Fru-1,6-BPase e da PFK-1 pela Fru-2,6-BP, e a parte de baixo, a regulação recíproca da piruvato desidrogenase (PDH) e da piruvato carboxilase (PC) pela acetil-CoA.

O EXCESSO DE CONSUMO DE ÁLCOOL PODE LEVAR À HIPOGLICEMIA

Um homem de meia-idade, emaciado e alcoólatra crônico entrou em colapso em um bar por volta das 11 h da manhã e foi transportado para a emergência por uma ambulância. Um outro cliente notou que o homem havia bebido somente pequenos tragos de vodca e não parecia estar anormalmente bêbado, embora estivesse um pouco confuso no momento em que desmaiou. O garçom sugeriu que o homem poderia ter tido um ataque cardíaco. O exame físico revelou uma pele pegajosa, anormal para uma manhã de inverno, respiração rápida e ritmo cardíaco elevado. Os testes laboratoriais indicaram glicose sanguínea de 2,5 mmol/L (50 mg/dL), na faixa hipoglicêmica, e nível sanguíneo de álcool de 0,2%, sugerindo intoxicação. Outros testes indicaram nível normal de troponina T, uma proteína medida para o diagnóstico precoce de infarto do miocárdio, alta atividade sérica de aspartato aminotransferase, indicativo de dano hepático (hepatite ou cirrose), pH sanguíneo ligeiramente acídico (7,29 contra um normal de 7,35), baixa pCO_2 e alto lactato sanguíneo. O homem respondeu a uma infusão de solução de glicose, recobrando a consciência, tomou um lanche reforçado e, poucas horas depois, após uma recuperação extraordinária, foi indicado a um conselheiro para tratamento. O que aconteceu?

Comentário. Provavelmente esse paciente não tomou café da manhã antes de iniciar sua bebedeira matinal. Seus estoques de glicogênio eram insignificantes, de tal forma que ele estava dependente da gliconeogênese para a manutenção da concentração de glicose sanguínea, mas a gliconeogênese poderia estar comprometida por doença hepática e por massa muscular limitada disponível para mobilizar aminoácidos para a gliconeogênese. O consumo de álcool adiciona estresse adicional à gliconeogênese, visto que o álcool é primariamente metabolizado no fígado. O metabolismo em dois passos do álcool é relativamente não regulado, levando a rápido aumento do NADH hepático.

Álcool desidrogenase:

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ + H^+ \rightarrow CH_3CHO + NADH$$

Aldeído desidrogenase:

$$CH_3CHO + NAD^+ + H^+ \rightarrow CH_3COOH + NADH$$

O aumento do NADH hepático altera o equilíbrio da reação da LDH em direção ao lactato, limitando a gliconeogênese a partir do piruvato derivado do lactato (ou alanina), levando a um acúmulo de ácido lático no sangue (lactacidemia). Ele também transforma o oxaloacetato citosólico em malato, reduzindo a gliconeogênese a partir dos intermediários do ciclo do ácido cítrico e transforma a di-hidroxiacetona fosfato em glicerol-3-fosfato, reduzindo a gliconeogênese a partir do glicerol. Assim, o desbalanço redox induzido pelo consumo de álcool leva a um grande aumento de NADH no citoplasma, inibindo o fluxo de todos os principais substratos (lactato, aminoácidos e glicerol) para a gliconeogênese. O baixo nível de glicose sanguínea leva a uma resposta de estresse (rápidos batimentos cardíacos, pele pegajosa), um esforço para aumentar a estimulação da gliconeogênese pela ação combinada do glucagon e da epinefrina. A respiração rápida é uma

resposta fisiológica à acidose metabólica, resultante de um excesso de ácido lático no sangue.

Quando a glicose entra no fígado após uma refeição, a insulina medeia a desfosforilação da PFK-2/Fru-2,6-BPase, ativando sua atividade PFK-2. O aumento resultante na Fru-2,6-BP ativa a PFK-1 e inibe a atividade da Fru-1,6-BPase. A gliconeogênese é inibida, e a glicose que entra no fígado é então incorporada ao glicogênio ou encaminhada para a glicólise para a lipogênese. Assim, o metabolismo hepático após uma refeição é focalizado na síntese e no armazenamento de reservas de energia de carboidratos e lipídeos, que serão mais tarde usados, no estado pós-absortivo, para a manutenção da glicose sanguínea e homeostasia dos ácidos graxos.

A gliconeogênese também é regulada na mitocôndria pela acetil-CoA. O influxo de ácidos graxos a partir do tecido adiposo, estimulado pelo glucagon para manter a gliconeogênese, leva a um aumento na acetil-CoA hepática, que é tanto um inibidor da piruvato desidrogenase (PDH) quanto um ativador alostérico essencial da piruvato carboxilase (PC) (Fig. 13.8). Dessa maneira, o metabolismo de gordura inibe a oxidação do piruvato e favorece seu uso para a gliconeogênese no fígado. No músculo durante o estado de jejum, a utilização da glicose para o metabolismo energético é limitada pelo baixo nível de GLUT-4 nas membranas plasmáticas (por causa da baixa concentração plasmática de insulina) e pela inibição da PDH pela acetil-CoA. O metabolismo ativo de gordura e os altos níveis de acetil-CoA no músculo promovem a excreção de uma fração significante de piruvato como lactato, mesmo no estado de repouso. O esqueleto de carbono da glicose retorna ao fígado através do ciclo de Cori (Cap. 21), e a reciclagem de piruvato em glicose na verdade conserva a proteína muscular.

Conversão de frutose e galactose em glicose

Como discutido em detalhes no capítulo 26, a frutose é metabolizada quase exclusivamente no fígado. Ela entra na glicólise no nível das trioses fosfato, desviando da reação da enzima regulatória, PFK-1, de tal modo que grande quantidade de piruvato possa ser forçada para a mitocôndria para o uso no metabolismo energético ou para a biossíntese de gordura. Durante o estado gliconeogênico, essa frutose também pode prosseguir em direção à Glc-6-P, fornecendo uma fonte conveniente de glicose sanguínea. A gliconeogênese a partir da galactose é igualmente eficiente, já que a Glc-1-P derivada da galactose 1-fosfato (Cap. 26) é facilmente isomerizada a Glc-6-P pela fosfoglicomutase. A frutose e a galactose são boas fontes de glicose independentemente da glicogenólise ou da gliconeogênese.



DEFICIÊNCIA DE FRUTOSE-1,6 BISFOSFATASE

Uma criança de três dias de idade foi avaliada para sepse por causa da aparente hiperventilação e períodos recorrentes de apneia. A glicose sanguínea estava baixa (2 mmol/L; hipoglicemia) e o lactato grosseiramente elevado a 15 mmol/L. A alimentação a cada 2 h parou novos ataques, mas observou-se que o fígado estava ligeiramente aumentado.

Comentário. Cerca de metade dos casos de deficiência de frutose-1,6-bifosfatase se apresenta com hipoglicemia e severa acidose lática nos primeiros dias de vida. A alimentação frequente com carboidrato previne problemas adicionais. A deficiência de FBPase prejudica a formação de glicose a partir de todos os precursores gliconeogênicos, e a normoglicemia é dependente da ingestão de glicose e da degradação do glicogênio hepático. A frequência dos ataques diminuiu com a idade, e a maioria das crianças afetadas tem desenvolvimento psicomotor normal.

Resumo

O glicogênio é armazenado em dois tecidos no corpo por razões diferentes: no fígado para a manutenção a curto prazo da homeostasia da glicose sanguínea e no músculo como fonte de energia. O metabolismo do glicogênio nesses tecidos responde rapidamente ao controle alostérico e hormonal. No fígado, o balanço entre a glicogenólise e a glicogênese é regulado pelo balanço entre as concentrações de glucagon e de insulina na circulação, que controla o estado de fosforilação de enzimas. A fosforilação de enzimas sob a influência do glucagon direciona a mobilização de glicogênio e é a condição mais comum no fígado, por exemplo, durante o sono. Aumentos na insulina sanguínea durante e após as refeições promovem a desfosforilação das mesmas enzimas, levando à glicogênese. A insulina também promove a captação de glicose pelo músculo e pelo tecido adiposo para a síntese de glicogênio e triglicerídeos após uma refeição. A epinefrina aumenta a fosforilação de enzimas hepáticas, facilitando uma explosão na glicogenólise hepática e um aumento na glicose sanguínea para as respostas ao estresse. O músculo também é responsivo à epinefrina, mas não ao glucagon; nesse caso, a glicose produzida pela glicogenólise é usada para o metabolismo energético no músculo — luta ou fuga. Em adição, a glicogenólise no músculo é responsiva ao Ca^{2+} intracelular e às concentrações de AMP, fornecendo um mecanismo para o acoplamento da glicogenólise ao consumo normal de energia durante o exercício. As ações da insulina, glucagon e epinefrina ilustram muitos dos princípios fundamentais da ação hormonal (Tabela 13.5).

Tabela 13.5 Características gerais da ação hormonal. A regulação hormonal do metabolismo da glicose ilustra os princípios fundamentais da ação hormonal (Cap. 39).

Caracteristicas gerais da ação hormonal
Especificidade tecidual, determinada pela distribuição do receptor
Várias etapas, amplificação em cascata
Mensageiros secundários intracelulares
Contrarregulação coordenada de vias opostas
Aumento e/ou oposição por outros hormônios
Múltiplos mecanismos de terminação da resposta

A gliconeogênese ocorre primariamente no fígado e é direcionada para a manutenção da glicose

sanguínea durante o estado de jejum. Ela é essencial após 12 h de jejum, quando a maioria do glicogênio hepático foi consumida. Os principais substratos para a gliconeogênese são o lactato, os aminoácidos e o glicerol; o metabolismo de ácidos graxos fornece a energia. O principal ponto de controle é no nível da fosfofrutocinase-1 (PFK-1), que é ativada pelo efetor alostérico Fru-2,6-BP. A síntese de Fru-2,6-BP está sob controle da enzima bifuncional PFK-2/Fru-2,6-BPase, cujas atividades cinase e fosfatase são reguladas pela fosforilação/desfosforilação, sob controle hormonal pela insulina e glucagon. Durante o jejum e a gliconeogênese ativa, o glucagon medeia a fosforilação e a ativação da atividade fosfatase dessa enzima, levando a uma diminuição no nível de Fru-2,6-BP e a uma redução correspondente na glicólise; a degradação de carboidratos é inibida, e as gorduras se tornam a fonte primária de energia durante o jejum e a inanição. A oxidação do piruvato também é inibida na mitocôndria pela inibição da PDH pela acetil-CoA derivada do metabolismo de gordura. Após uma refeição, a diminuição na fosforilação de enzimas aumenta a atividade da PFK-2; o aumento na concentração de Fru-2,6-BP ativa a PFK-1 e promove a glicólise, fornecendo piruvato, que é convertido a acetil-CoA para a lipogênese.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. A inativação da glicogênese em resposta à epinefrina ocorre em um único passo pela ação da PKA na glicogênio sintase, enquanto a ativação da glicogenólise envolve uma enzima intermediária, a fosforilase cinase, que fosforila a fosforilase. Discuta as vantagens metabólicas da ativação em dois passos da glicogenólise.

2. Investigue o uso de inibidores da gliconeogênese para o tratamento do diabetes tipo 2.

3. A glicose-6-fosfatase é essencial para a produção de glicose no fígado, mas não é uma enzima citosólica. Descreva a atividade e a localização subcelular dessa enzima e os estágios finais da via para a produção de glicose no fígado.

Leituras sugeridas

Beale EG, Harvey BJ, Forest C. PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes. *Cell Biochem Biophys*. 2007;48:89-95.

Boden G. Gluconeogenesis and glycogenolysis in health and diabetes. *J Invest Med*. 2004;52:375-378.

Bongaerts GP, van Halteren HK, Verhagen CA, Wagener DJ. Cancer cachexia demonstrates the energetic impact of gluconeogenesis in human metabolism. *Med Hypotheses*. 2006;67:213-1222.

de Lonlay P, Giurgea I, Touati G, Saudubray JM. Neonatal hypoglycaemia: aetiologies. *Semin Neonatol*. 2004;9:49-58.

Geel TM, McLaughlin PM, de Leij LF, Ruiters MH, Niezen-Koning KE. Pompe disease: current state of treatment modalities and animal models. *Mol Genet Metab*. 2007;92:299-307.

Hume R, Burchell A, Williams FL, Koh DK. Glucose homeostasis in the newborn. *Early Hum Dev*. 2005;81:95-101.

Lomako J, Lomako WM, Whelan WJ. Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1673:45-55.

Ozen H. Glycogen storage diseases: new perspectives. *World J Gastroenterol*. 2007;13(18):2541-2553.

Wu C, Okar DA, Kang J, Lange AJ. Reduction of hepatic glucose production as a therapeutic target in the treatment of diabetes. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2005;5:51-59.

Sites

Gliconeogênese Gliconeogênese. www.wiley.com/legacy/college/boyer/0470003790/animation/gluconeogenesis/gluconeogenesis.htm.

Glicogênio Glicogênio:

- http://bip.cnrs-mrs.fr/bip10/glycogen.htm
- www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb*mb1/part2/9-glycogen.ppt

Hipoglicemia Hipoglicemia. http://diabetes.niddk.nih.gov/dm/pubs/hypoglycemia/index.htm.

O Ciclo do Ácido Tricarboxílico

L.W. Stillway

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Resumir a sequência de reações do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e explicar o propósito do ciclo.
- Identificar as quatro enzimas oxidativas no ciclo do TCA e seus produtos.
- Identificar os dois intermediários necessários na primeira etapa do ciclo do TCA e suas fontes metabólicas.
- Identificar os quatro principais intermediários metabólicos sintetizados a partir de intermediários do ciclo do TCA.
- Descrever como o ciclo do TCA é regulado pelo suprimento de substrato, efetores alostéricos, modificação covalente e síntese proteica.
- Explicar por que não existe síntese líquida da glicose a partir da acetil-CoA.
- Explicar o conceito de “substrato suicida” como aplicado no ciclo do TCA.

INTRODUÇÃO

Localizado na mitocôndria, o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), também conhecido como ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico, é uma via comum do metabolismo para todos os combustíveis. Ele retira oxidativamente elétrons de gorduras, dos carboidratos e proteínas, produzindo a maioria das coenzimas reduzidas que são utilizadas para gerar o trifosfato de adenosina (ATP) na cadeia transportadora de elétrons. Embora o ciclo do TCA não utilize oxigênio em nenhuma das reações, ele necessita do metabolismo oxidativo na mitocôndria para a reoxidação das coenzimas reduzidas. O ciclo do TCA possui duas funções principais: produção de energia e biossíntese (Fig. 14.1).

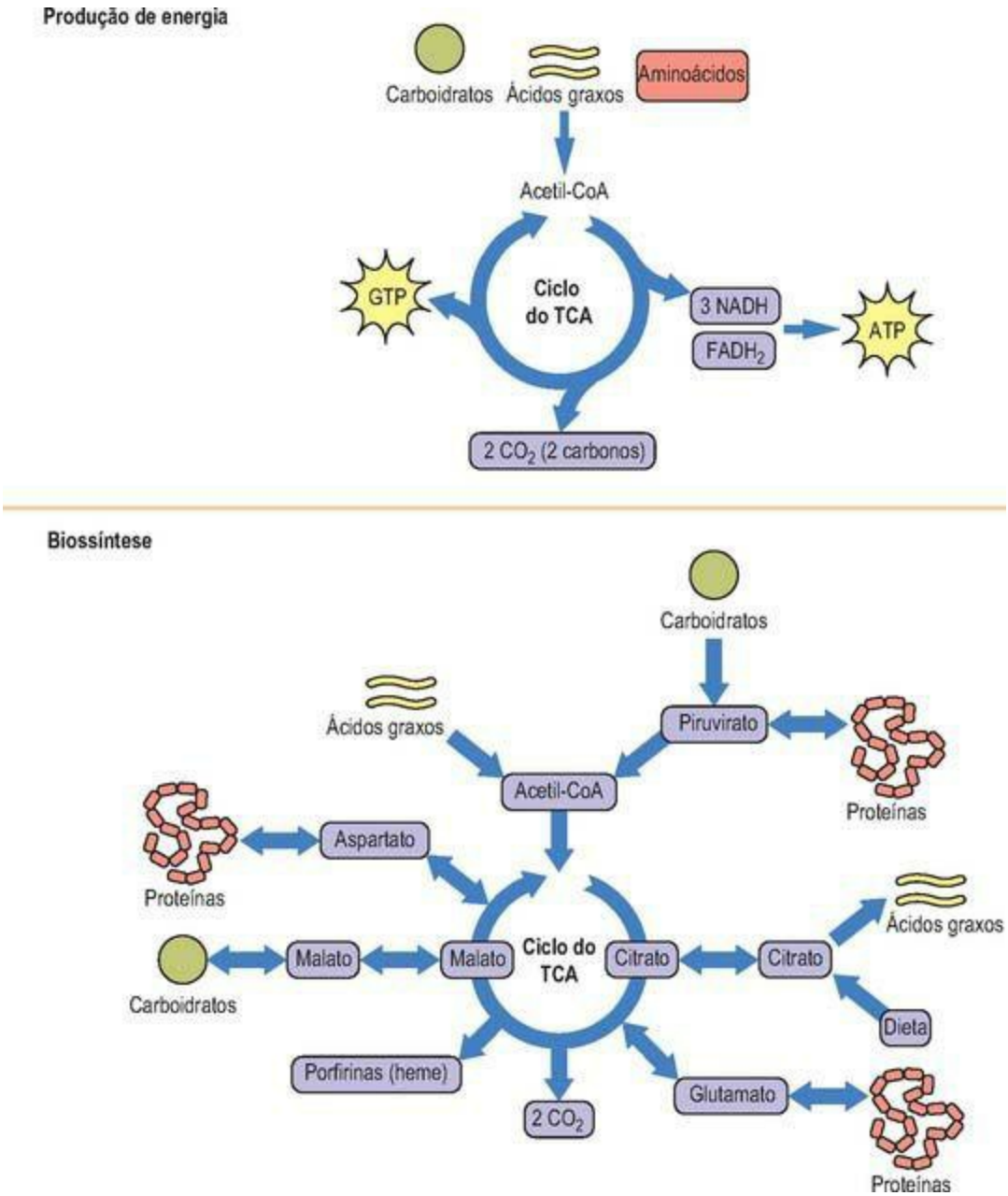


Fig. 14.1 Natureza anfibólica do ciclo do TCA. O ciclo do TCA fornece energia e metabólitos para o metabolismo celular. Devido à natureza anabólica e catabólica do ciclo do TCA, ele é descrito como anfibólico. FAD, flavina adenina dinucleotídeo; GDP, guanosina difosfato; NADH, nicotinamida adenina dinucleotídeo; Pi, fosfato inorgânico.

FUNÇÕES DO CICLO DO ÁCIDO TRICARBOXÍLICO

Quatro etapas oxidativas fornecem energia livre para a síntese do ATP

Um produto final comum do metabolismo dos carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos, a acetil-CoA é oxidada no ciclo do TCA para produzir coenzimas reduzidas em quatro reações redox por volta do ciclo. Três produzem nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e a outra produz flavina adenina dinucleotídeo reduzida ($FADH_2$). Estes nucleotídeos reduzidos fornecem energia para a síntese de ATP pelo sistema de transporte de elétrons (Cap. 9). Um fosfato de alta-energia, a guanosina trifosfato (GTP), é também produzido no ciclo pela fosforilação em nível de substrato. Praticamente todo o dióxido de carbono metabólico é produzido por reações de descarboxilação catalisadas pela piruvato desidrogenase e por enzimas do ciclo do TCA na mitocôndria.

O ciclo do TCA fornece uma base comum para a interconversão de combustíveis e metabólitos

O ciclo do TCA (Fig. 14.1) participa na síntese da glicose a partir dos aminoácidos e de lactato durante a fome e o jejum (gliconeogênese, Cap. 13). Está envolvido também na conversão dos carboidratos em gordura após uma refeição rica em carboidratos (Cap. 16). Ele é uma fonte de aminoácidos não essenciais, como o aspartato e glutamato, que são sintetizados diretamente a partir de intermediários do ciclo do TCA. Um intermediário do ciclo do TCA, a succinil-coenzima A (succinil CoA), serve como precursor para as porfirinas (heme), em todas as células, mas especialmente na medula óssea e no fígado (Cap. 29). As reações biossintéticas derivadas do ciclo do TCA necessitam da entrada de carbonos a partir de outros intermediários que não a acetil-CoA. Tais reações são conhecidas como reações anapleróticas (de preenchimento).

A acetil-CoA é um produto comum de várias vias catabólicas

O ciclo do TCA inicia-se com a acetil-CoA, que possui três precursores metabólicos principais (Fig. 14.2). Os carboidratos sofrem glicólise gerando piruvato (Cap. 12), que pode ser incorporado pela mitocôndria e descarboxilado oxidativamente para acetil-CoA pelo complexo piruvato desidrogenase. Durante a lipólise, os triacilgliceróis são convertidos em glicerol e ácidos graxos livres, que são captados pelas células e transportados para as mitocôndrias quando, então, sofrem oxidação a acetil-CoA (Cap. 15). Finalmente, a proteólise das proteínas teciduais libera os aminoácidos constituintes, muitos dos quais são metabolizados a acetil-CoA e em intermediários do ciclo do TCA (Cap. 19).

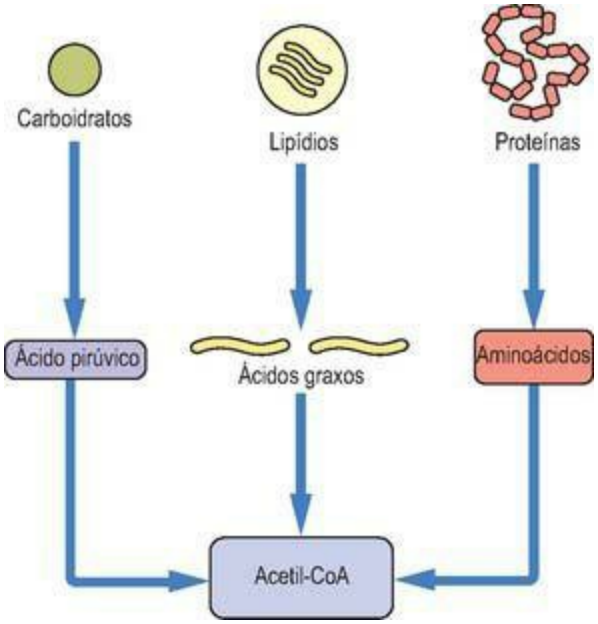


Fig. 14.2 Fontes metabólicas de acetil-CoA. Os carboidratos, os lipídios e os aminoácidos são precursores da acetil-CoA mitocondrial necessária para a operação do ciclo do TCA.

A primeira versão do ciclo do TCA, proposta por Krebs em 1937, iniciava com o ácido pirúvico, não pela acetil-CoA. O ácido pirúvico era descarboxilado e condensado com o ácido oxaloacético, através de um mecanismo desconhecido, para formar ácido cítrico. O intermediário essencial, acetil-CoA, foi identificado anos depois. É tentador iniciar o ciclo do TCA com o ácido pirúvico, a menos que seja reconhecido que ácidos graxos e muitos aminoácidos formam acetil-CoA por vias que não incluem o piruvato. É por esta razão que se afirma que o ciclo do TCA é iniciado com a acetil-CoA, não com o ácido pirúvico.

O ciclo do TCA está localizado na mitocôndria

A localização do ciclo do TCA na matriz mitocondrial é importante metabolicamente; isto permite que intermediários idênticos sejam utilizados dentro e fora da mitocôndria com propósitos diferentes. A acetil-CoA, por exemplo, não pode atravessar a membrana mitocondrial interna. O destino principal da acetil-CoA mitocondrial é sua oxidação no ciclo do TCA, mas, no citoplasma, ela é utilizada para a biossíntese de ácidos graxos e colesterol.

Os defeitos metabólicos no ciclo do TCA são raros

Os defeitos metabólicos envolvendo enzimas do ciclo do TCA são raros, porque o funcionamento normal do ciclo é absolutamente essencial para a manutenção da vida. Os produtos das vias produtoras de energia devem ser metabolizados no ciclo do TCA para a produção eficiente de ATP. Qualquer defeito no ciclo do TCA limitará produção de ATP, e células privadas de ATP morrem rapidamente ou são altamente prejudicadas funcionalmente. Os tecidos que utilizam oxigênio em alta velocidade, como o sistema nervoso central e os músculos, são os mais suscetíveis a estes defeitos.

PIRUVATO CARBOXILASE

O piruvato pode ser convertido diretamente a quatro metabólitos diferentes

O piruvato está em uma encruzilhada no metabolismo. Ele pode ser convertido num passo a lactato (lactato desidrogenase), a alanina (alanina aminotransferase, ALT), a oxaloacetato (piruvato carboxilase) e a acetil-CoA (complexo piruvato desidrogenase) (Fig. 14.3). Dependendo das circunstâncias metabólicas, o piruvato pode ser direcionado para a gliconeogênese (Cap. 13), para a biossíntese de ácidos graxos (Cap. 16) ou para o próprio ciclo do TCA. A piruvato carboxilase, como a maioria das outras carboxilases, utiliza CO_2 e a coenzima biotina (Fig. 14.4), uma vitamina hidrossolúvel, e ATP para impulsionar a reação de carboxilação. A enzima é um tetrâmero de subunidades idênticas, cada uma delas contendo um sítio alostérico que liga a acetil-CoA, um modificador heterotrópico positivo. De fato, a piruvato carboxilase possui uma necessidade absoluta de acetil-CoA; a enzima não trabalha na sua ausência. Uma abundância de acetil-CoA mitocondrial age como um sinal para a geração de oxaloacetato adicional. Por exemplo, quando a lipólise é estimulada, os níveis de acetil-CoA intramitocondrial elevam-se, o que alostericamente ativa a piruvato carboxilase a produzir oxaloacetato adicional para a gliconeogênese (Cap. 13).

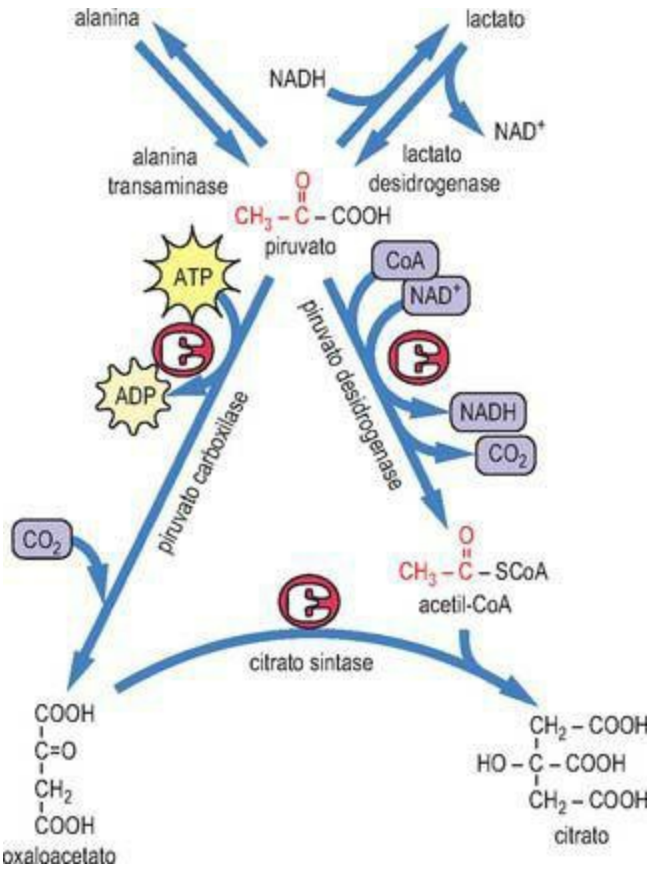


Fig. 14.3 O piruvato está em uma encruzilhada do metabolismo. O piruvato é rapidamente formado a partir do lactato ou da alanina. A acetil-CoA e o oxaloacetato são derivados do piruvato através da ação catalítica da piruvato desidrogenase e da piruvato carboxilase, respectivamente. ADP, adenosina difosfato.

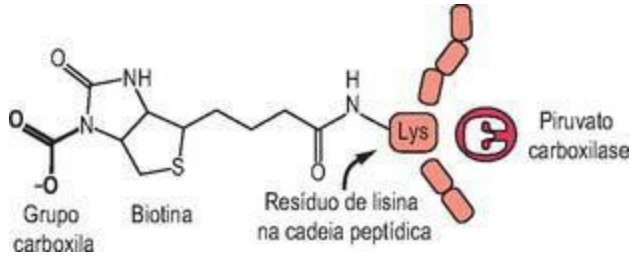


Fig. 14.4 O intermediário carboxil-biotina. A piruvato carboxilase catalisa a carboxilação do piruvato em oxaloacetato. A coenzima biotina está covalentemente ligada à piruvato carboxilase e transfere o carbono originário do CO_2 para o piruvato (Cap. 11).

MEDIDAS DE LACTATO

O ácido lático é medido em um cenário clínico porque seu acúmulo pode resultar em uma morte rápida. O ácido lático é produzido metabolicamente pela redução reversível do piruvato com NADH pela enzima lactato desidrogenase (LDH). Tanto o lactato quanto o piruvato coexistem nos sistemas metabólicos e a relação piruvato:lactato é aproximadamente proporcional à relação citosólica de NAD^+/NADH. O lactato e o piruvato contribuem para a acidez dos líquidos biológicos; no entanto, o lactato está geralmente presente em maiores concentrações e é mais facilmente dosado. O lactato sanguíneo pode aumentar na doença pulmonar obstrutiva crônica e durante o exercício intenso. Sua medição é normalmente indicada quando há acidose metabólica, caracterizada por um elevado intervalo aniônico (ânion *gap*), $[Na^+] - ([Cl^-] + [CO_2])$, indicando a presença de ânion(s) desconhecido(s) no plasma. Embora rara, a acidose láctica pode ser causada por defeitos metabólicos em vias produtoras de energia, como algumas das doenças de armazenamento de glicogênio ou em qualquer enzima das vias do piruvato para gerar ATP, incluindo o complexo piruvato desidrogenase, o ciclo do TCA, o sistema de transporte de elétrons ou a ATP sintase.

O COMPLEXO PIRUVATO DESIDROGENASE

O complexo piruvato desidrogenase (CPD) serve como uma ponte entre os carboidratos e o ciclo do TCA (Fig. 14.5). O CPD é uma das várias α-cetoácido desidrogenases com mecanismos de reação análogos, incluindo a α-cetoglutarato desidrogenase do ciclo do TCA e as α-cetoácido desidrogenases associadas com o catabolismo de leucina, isoleucina e valina. Sua irreversibilidade explica em parte por que a acetil-CoA não pode produzir uma síntese líquida de glicose. O complexo funciona como uma unidade consistindo de três enzimas principais:

- piruvato desidrogenase
- di-hidrolipoil transacetilase
- di-hidrolipoil desidrogenase

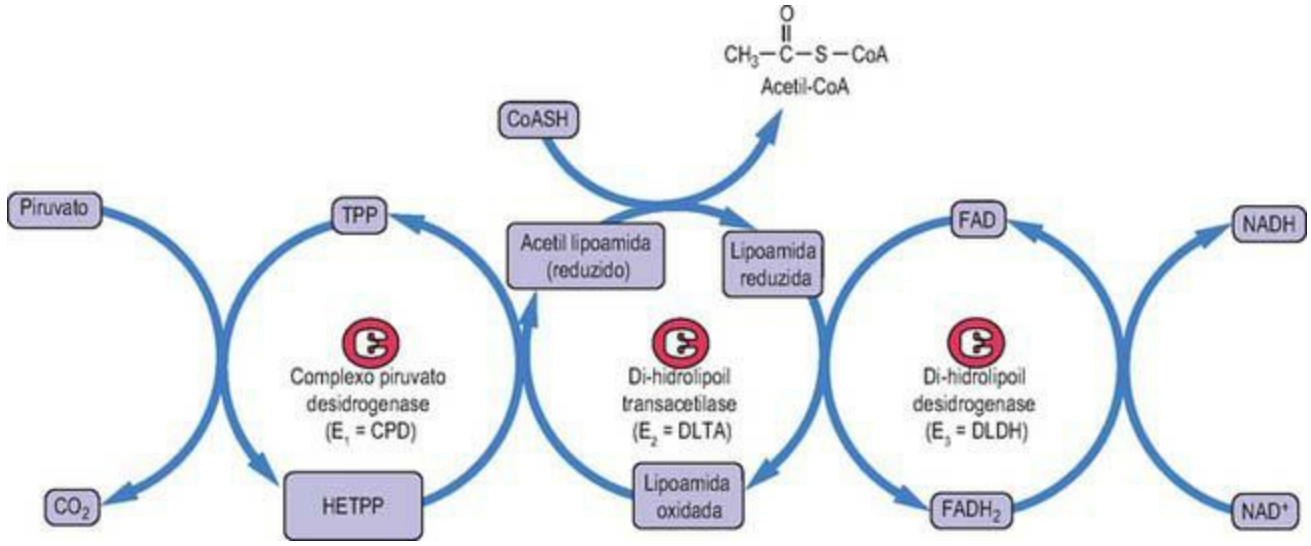


Fig. 14.5 Mecanismo de ação do complexo piruvato desidrogenase. As três enzimas componentes do complexo piruvato desidrogenase são a piruvato desidrogenase (E_1=PHD), di-hidrolipoil transacetilase (E_2=DLTA) e a di-hidrolipoil desidrogenase (E_3=DLDH). O piruvato é primeiro descarboxilado pela enzima contendo tiamina pirofosfato (E_1), formando CO_2 e hidroxietil-tiamina pirofosfato (HETPP). A lipoamida, o grupo prostético na E_2, serve como um carreador na transferência de uma unidade de 2 carbonos do HETPP para a coenzima A (CoA). A forma oxidada, um dissulfeto cíclico, da lipoamida aceita o grupo hidroxietil da HETPP. A lipoamida é reduzida e o grupo hidroxietil convertido em um grupo acetil durante esta reação de transferência, formando acetildi-hidrolipoamida. Após a transferência do grupo acetil para a CoA, a E_3 reoxida a lipoamida, utilizando FAD, e o $FADH_2$ é, por sua vez, oxidado pelo NAD^+, gerando NADH.

Os intermediários são ligados ao componente transacetilase do complexo durante a sequência de reações (Figs. 14.5 e 14.6). Isso otimiza a eficiência catalítica da enzima uma vez que não há equilíbrio do substrato na solução.

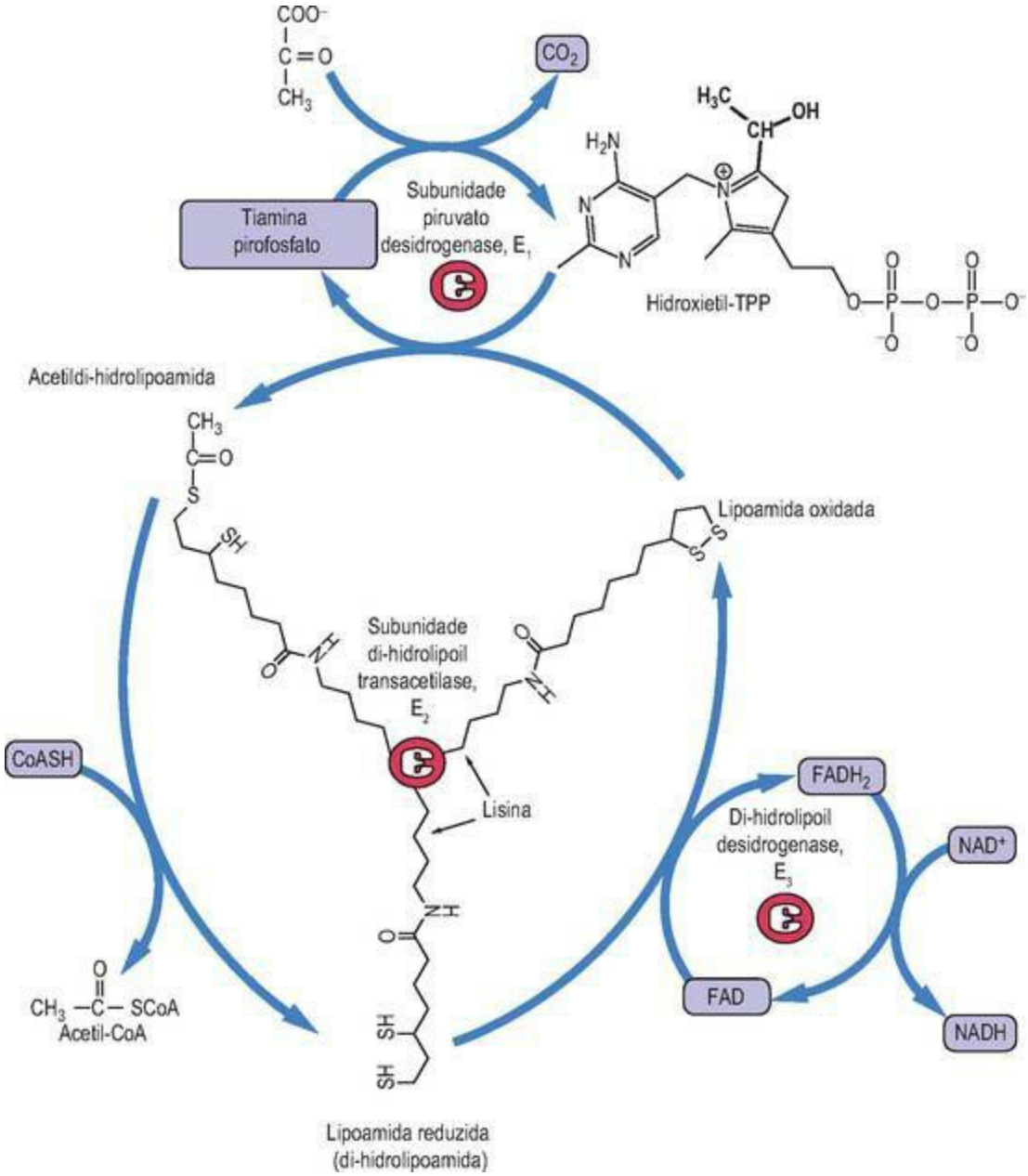


Fig. 14.6 Ácido lipoico no complexo piruvato desidrogenase. A coenzima lipoamida está ligada a um resíduo de lisina na subunidade transacetilase da piruvato desidrogenase. A lipoamida se move de um sítio a outro na subunidade transacetilase através de um mecanismo de "braço giratório". As estruturas da tiamina pirofosfato (TPP) e da lipoamida são mostradas.

Duas enzimas adicionais do complexo, a piruvato desidrogenase quinase e a piruvato desidrogenase fosfatase, regulam sua atividade pela modificação covalente via fosforilação/desfosforilação reversível. Há quatro isoformas conhecidas de quinases e duas de fosfatases; as quantidades relativas de cada uma delas são células-específicas.

Cinco coenzimas são necessárias para a atividade de CPD: tiamina pirofosfato, lipoamida (ácido lipoico ligado por uma ligação amida à proteína), CoA, FAD e NAD^+. Quatro vitaminas são necessárias para sua síntese: tiamina, ácido pantotênico, riboflavina e nicotinamida. A deficiência em qualquer uma destas vitaminas tem efeitos óbvios no metabolismo energético. Por exemplo, o aumento nas concentrações celulares de piruvato e de α-cetoglutarato é encontrado no beribéri por causa da deficiência de tiamina (Cap. 11). Neste caso, todas as proteínas estão disponíveis, mas a coenzima importante não está, e as conversões do piruvato para acetil-CoA e do α-cetoglutarato para succinil-CoA estão significativamente reduzidas. Os sintomas incluem debilidade cardíaca e dos músculos esqueléticos e doença neurológica. A deficiência de tiamina é comum no alcoolismo

porque as bebidas destiladas são desprovidas de vitaminas, e os sintomas do beribéri são frequentemente observados.

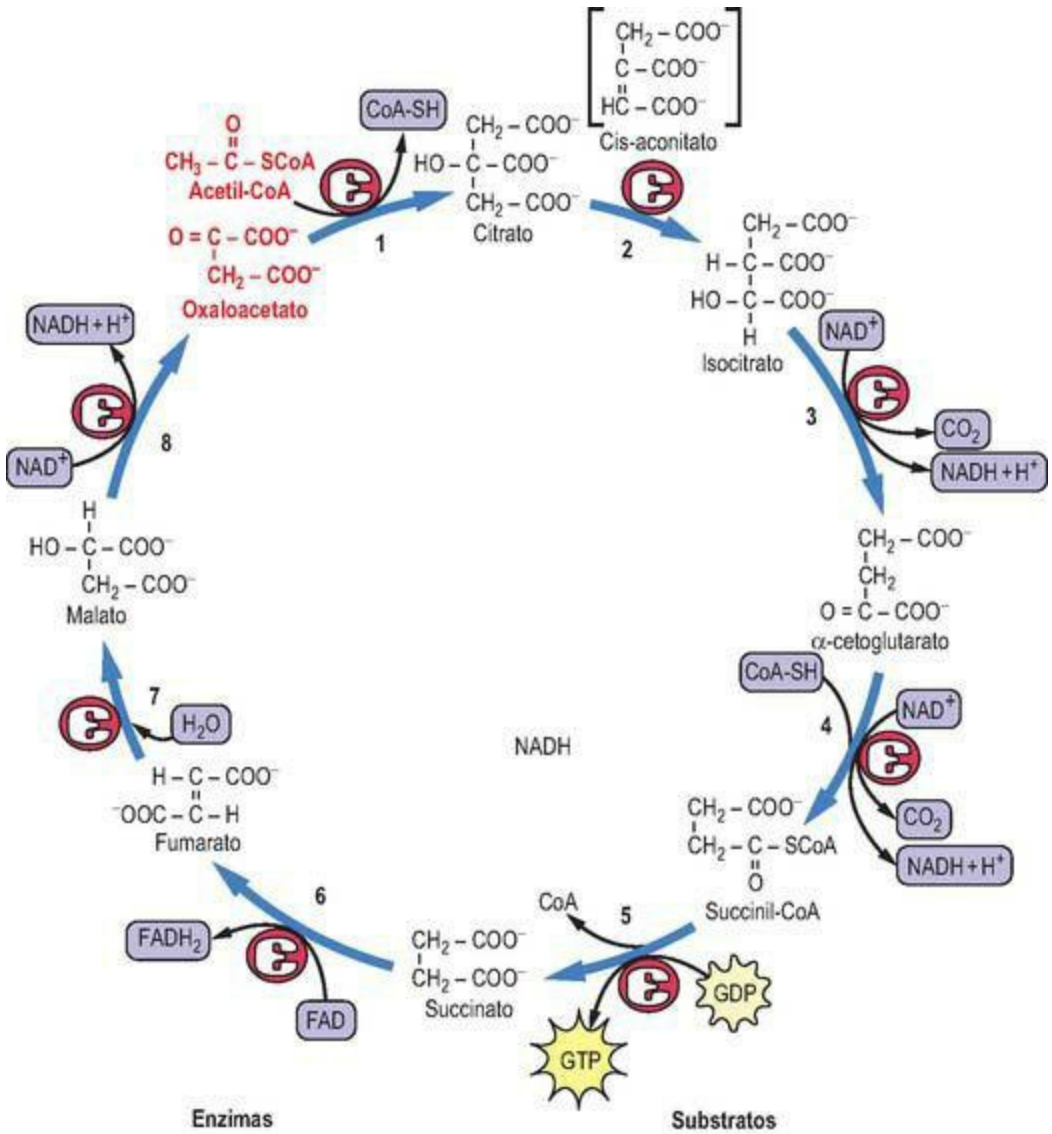
DEFICIÊNCIA NO COMPLEXO PIRUVATO DESIDROGENASE

A maioria das crianças com esta deficiência enzimática apresenta na infância uma demora no desenvolvimento e tonicidade muscular reduzida frequentemente associada a ataxia e convulsões. Algumas crianças possuem malformações congênitas no cérebro.

Comentário. Sem a oxidação mitocondrial, o piruvato é reduzido a lactato. O rendimento de ATP a partir da glicólise anaeróbica é menos de um décimo daquele produzido a partir da oxidação completa da glicose através ciclo do ácido tricarboxílico. O diagnóstico é feito pelo lactato elevado, mas com uma taxa lactato:piruvato normal, ou seja, não há evidência de hipóxia. Uma dieta cetogênica e com restrição severa de proteínas (<15%) e carboidratos (<5%) melhora o desenvolvimento mental. Tal tratamento garante que as células utilizem acetil-CoA a partir do metabolismo de gorduras. Algumas poucas crianças mostram uma redução no lactato plasmático no tratamento com altas doses de tiamina, mas as perspectivas são geralmente ruins.

ENZIMAS E REAÇÕES DO CICLO DO ÁCIDO TRICARBOXÍLICO

O ciclo do TCA é uma sequência de oito reações enzimáticas (Fig. 14.7), iniciando-se com a condensação da acetil-CoA com o oxaloacetato para formar citrato. O oxaloacetato é regenerado ao completar-se o ciclo. Das quatro oxidações no ciclo, duas envolvem descarboxilações. Três produzem NADH e uma produz $FADH_2$. O GTP, um fosfato de alta-energia, também é produzido em uma etapa pela fosforilação em nível de substrato.



Enzimas

(1) Citrato sintase
(2) Aconitase
(3) Isocitrato desidrogenase
(4) α-cetoglutarato desidrogenase
(5) Succinil-CoA sintase (succinato tioquinase)
(6) Succinato desidrogenase
(7) Fumarase
(8) Malato desidrogenase

Substratos

1→2 Citrato
2→3 Isocitrato
3→4 α-cetoglutarato
4→5 Succinil-CoA
5→6 Succinato
6→7 Fumarato
7→8 Malato
8→1 Oxaloacetato

NOTA DO EDITOR: No texto em vermelho, na figura 14.7, onde se lê Acetyl, leia-se Acetil e onde se lê Oxaloacetate, leia-se Oxaloacetato.

Fig. 14.7 Enzimas e intermediários do ciclo do TCA.

Citrato sintase

A citrato sintase inicia o ciclo do TCA catalisando a condensação da acetil-CoA e do oxaloacetato para formar ácido cítrico. A reação é impulsionada pela clivagem da ligação tioéster de alta-energia do citroil-CoA, um intermediário da reação. Uma enzima posterior do ciclo do TCA, a succinil-CoA sintetase, utiliza a ligação tioéster de alta-energia da succinil-CoA para produzir GTP, um fosfato de alta-energia.

TOXICIDADE DO FLUOROACETATO –UM SUBSTRATO SUICIDA

O fluoroacetato, inicialmente isolado de plantas, é uma potente toxina. Ele é ativado pelo fluoroacetil-CoA e então condensado com o oxaloacetato para formar fluorocitrato (Fig. 14.8). A morte resulta da inibição do ciclo do TCA pelo 2-fluorocitrato, um potente inibidor da aconitase. O fluoroacetato é um exemplo de "substrato suicida", um composto que não é tóxico *per se*, mas é metabolicamente ativado em um produto tóxico. Então, a célula é dita suicida por converter um substrato aparentemente inofensivo em uma toxina letal. Processos semelhantes estão envolvidos na ativação de muitos pró-carcinógenos ambientais que induzem mutações no DNA.

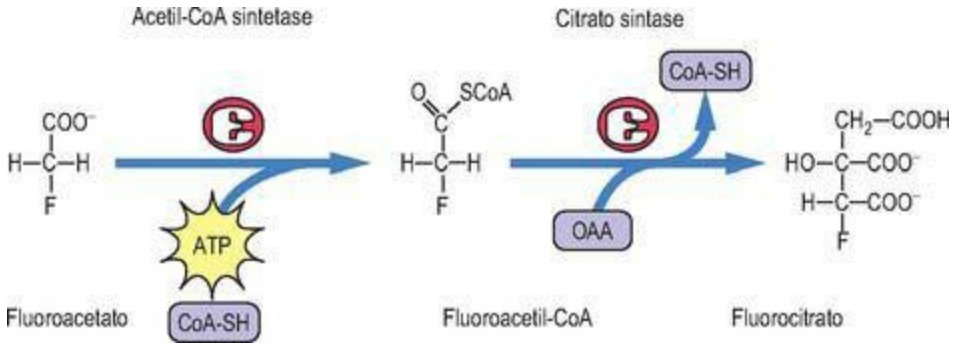


Fig. 14.8 A toxicidade do fluoroacetato — um substrato suicida. O fluoroacetato é um inibidor competitivo da aconitase. OAA, oxaloacetato.

Aconitase

A aconitase é uma proteína ferro-enxofre (Cap. 9) que isomeriza o citrato a isocitrato através do intermediário *cis*-aconitato ligado à enzima. A reação de duas etapas é reversível e envolve a desidratação seguida por hidratação. Embora o citrato seja uma molécula simétrica, a aconitase trabalha especificamente na extremidade oxaloacetato do citrato, não na extremidade derivada da acetil-CoA (Fig. 14.9). Tal especificidade estereoquímica ocorre devido à geometria do sítio ativo da aconitase (Fig. 14.10). Uma proteína citosólica com atividade de aconitase, conhecida como IRE-BP (proteína de ligação de elemento de resposta a ferro) funciona na regulação do armazenamento do ferro.

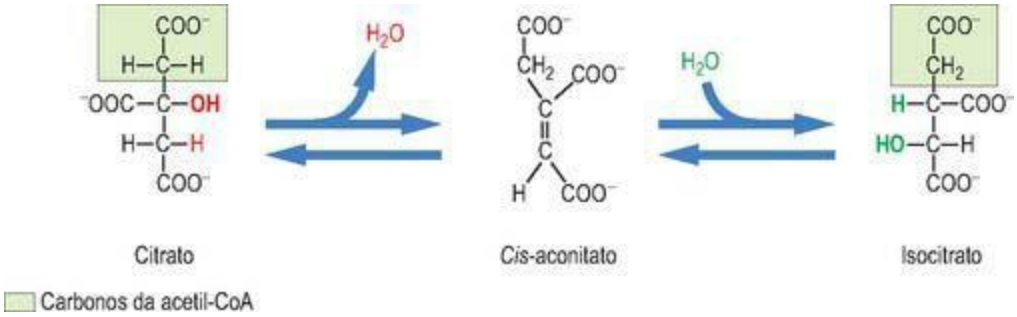


Fig. 14.9 A especificidade da isomerização durante a reação da aconitase.

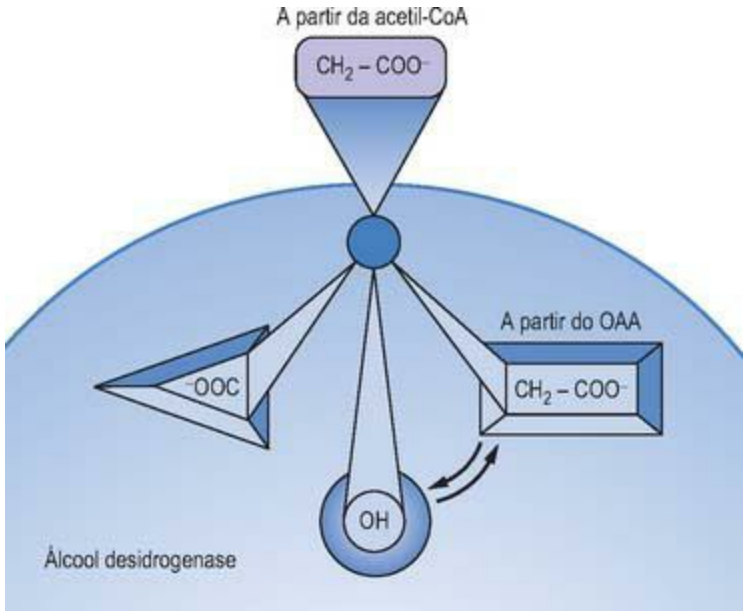


Fig. 14.10 Estereoquímica da reação da aconitase. A aconitase converte o citrato aquiral em uma forma quiral específica de isocitrato. A ligação do grupamento hidroxila (OH) no carbono 3 e dos grupos carboxilatos (COO^-) do citrato na superfície da enzima coloca o grupo carboximetil ($-CH_2-COO^-$), derivado da extremidade oxaloacetato da molécula, em contato com o terceiro lócus de ligação no sítio ativo da aconitase. Isso garante a transferência do grupo OH para o grupo CH_2 derivado do oxaloacetato, indicado pelas setas, em vez de para aquele derivado do grupo acetil. OAA, oxaloacetato.

ESTEREOESPECIFICIDADE DE ENZIMAS

A aconitase catalisa a isomerização na extremidade oxaloacetato da molécula de citrato. No entanto, o citrato não possui centros assimétricos; ele é aquiral. Como a aconitase conhece qual é a "extremidade superior"? A resposta reside na natureza da ligação do citrato no sítio ativo da aconitase, um processo conhecido como ligação em três pontos. Como ilustrado na Figura 14.10, devido à geometria do sítio ativo da aconitase, existe somente uma forma para o citrato ligar-se. Esta "ligação de três pontos" coloca os carbonos do oxaloacetato na orientação apropriada para a reação de isomerização, enquanto os carbonos derivados da acetil-CoA são excluídos do sítio ativo. Embora o citrato seja uma molécula simétrica ou aquiral, ele é denominado "proquiral" porque é convertido em uma molécula quiral, o isocitrato. Tipos semelhantes de processos de ligação de três pontos estão envolvidos nas reações de transaminases que produzem exclusivamente L-aminoácidos a partir de cetoácidos. A redução do anel de nicotinamida pelas desidrogenases dependentes de NAD(H) é também estereoespecífica. Algumas desidrogenases colocam o hidrogênio adicionando exclusivamente na face frontal do anel de nicotinamida (visualizado com o grupo amida à direita), enquanto outras adicionam o hidrogênio somente na face posterior (Fig. 14.11 e Cap. 6).

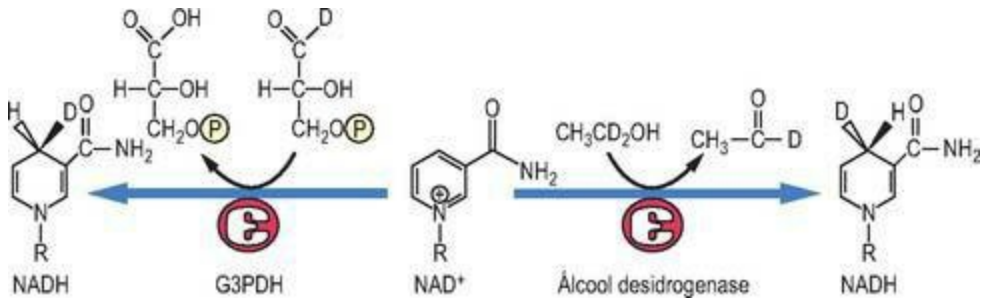


Fig. 14.11 A regulação do complexo piruvato desidrogenase. O complexo piruvato desidrogenase regula o fluxo de piruvato no ciclo do TCA. NAD(H), ATP e acetil-CoA exercem controle tanto alostérico quanto covalente sobre a atividade da enzima. CPD, piruvato desidrogenase; TA, di-hidrolipoil transacetilase; DHLD, subunidade di-hidrolipoamida desidrogenase.

Isocitrato desidrogenase e α-cetoglutarato desidrogenase

A isocitrato desidrogenase e o complexo α-cetoglutarato desidrogenase catalisam duas reações de descarboxilação oxidativa sequenciais nas quais o NAD^+ é reduzido a NADH e o CO_2 é liberado. A primeira destas enzimas, a isocitrato desidrogenase, catalisa a conversão do isocitrato em α-cetoglutarato. Ela é uma importante enzima reguladora que é inibida sob condições ricas em energia pelos altos níveis de NADH e ATP, e é ativada quando o NAD^+ e o ADP são produzidos pelo metabolismo. A inibição desta enzima após uma refeição rica em carboidratos causa um acúmulo intramitocondrial de citrato, o qual é então exportado para o citosol para a lipogênese (Cap. 16). O citrato é também um importante efetor alostérico, inibindo a fosfofrutoquinase-1 (Cap. 12) e ativando a acetil-CoA carboxilase.



DEFICIÊNCIAS NO METABOLISMO DO PIRUVATO NO CICLO DO TCA

Uma criança de 7 meses de idade mostrava deterioração neurológica progressiva caracterizada pela perda da coordenação e do tônus muscular. Ela era incapaz de manter sua cabeça na posição vertical e tinha grande dificuldade de movimentar seus membros, que eram moles. Ela também sofria de uma acidose contínua. A administração de tiamina não fazia efeito. As dosagens mostraram que a criança tinha níveis sanguíneos elevados de lactato, α-cetoglutarato e aminoácidos de cadeias ramificadas. A criança morreu uma semana depois. O fígado, o cérebro, os rins, os músculos esqueléticos e o coração foram examinados após o óbito e todas as enzimas gliconeogênicas se mostravam com atividades normais, mas tanto a piruvato desidrogenase como a α-cetoglutarato desidrogenase eram deficientes. O componente defeituoso era a di-hidrolipoil desidrogenase (E_3), a qual é um produto de um único gene necessário para todas as α-cetoácido desidrogenases.

Comentário. Este é um exemplo de uma das muitas variantes da doença de Leigh, que é um grupo de desordens caracterizadas pela acidose láctica. O ácido láctico acumula sob condições anaeróbicas ou devido a um defeito enzimático na via a partir do piruvato para a síntese do ATP. Neste caso, existem defeitos no complexo piruvato desidrogenase e no complexo α-cetoglutarato desidrogenase, bem como em outros complexos de α-cetoácidos desidrogenases, necessários para o catabolismo dos aminoácidos de cadeias ramificadas. A falha no metabolismo aeróbico leva ao aumento dos níveis sanguíneos de lactato, α-cetoglutarato e aminoácidos de cadeias ramificadas. Os tecidos que dependem do metabolismo aeróbico, tais como o cérebro e os músculos, são os mais gravemente afetados, e o quadro clínico inclui funções motoras debilitadas, desordens neurológicas e retardo mental. Estas doenças são raras, mas as deficiências na priruvato carboxilase e em todos os componentes do complexo piruvato desidrogenase (CPD) têm sido descritas, incluindo as quinases e fosfatases associadas (Fig. 14.12).

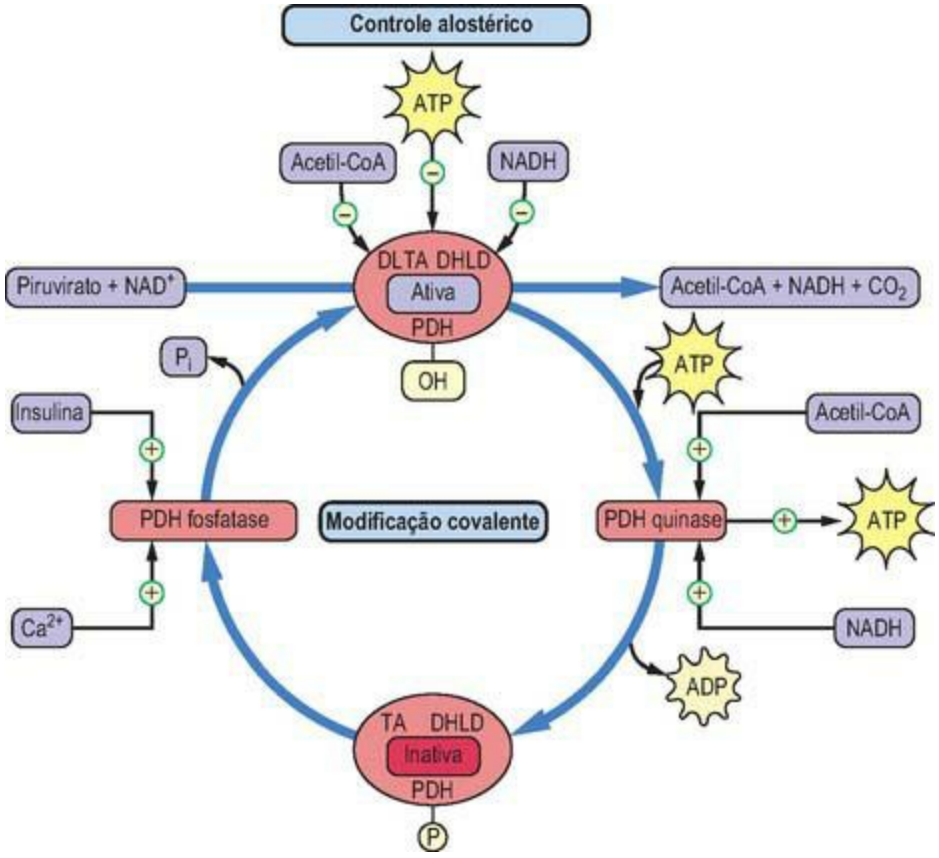


Fig. 14.12 Estereoquímica da redução do NAD^+ por desidrogenases. A álcool desidrogenase coloca o íon hidrogênio na face frontal do anel de nicotinamida, enquanto a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) coloca o hidrogênio na face posterior do anel. As duas posições podem ser diferenciadas usando-se substratos marcados com deutério (D).

A segunda desidrogenase, o complexo α-cetoglutarato desidrogenase, catalisa a descarboxilação oxidativa do α-cetoglutarato a NADH, CO_2 e succinil-CoA, um composto tioéster de alta-energia. Tal como o complexo piruvato desidrogenase, este complexo enzimático contém três subunidades que possuem as mesmas designações da piruvato desidrogenase (E_1, E_2 e E_3). A E_3 é idêntica nos dois complexos e é codificada pelo mesmo gene. Os mecanismos de reação e os cofatores tiamina pirofosfato, lipoato, CoA, FAD e NAD^+ são os mesmos. Ambas as enzimas iniciam com um α-cetoácido, piruvato ou α-cetoglutarato, e ambas formam ésteres de CoA, acetil-CoA ou succinil-CoA, respectivamente.

Neste ponto, o rendimento de carbono do ciclo do TCA é zero, ou seja, 2 carbonos foram introduzidos como acetil-CoA e dois foram liberados na forma de CO_2. Observa-se, no entanto, que por causa da assimetria da reação da aconitase, nenhuma molécula de CO_2 produzida nesta primeira rodada através do ciclo do TCA é originada dos carbonos da acetil-CoA, pois são derivados a partir da extremidade oxaloacetato da molécula de citrato. Ambos os carbonos originados a partir da acetil-CoA permanecem nos intermediários do ciclo do TCA e podem aparecer em compostos produzidos nas reações biossintéticas derivadas do ciclo do TCA, incluindo a glicose, o ácido aspártico e o heme. No entanto, por causa da perda de duas moléculas de CO_2 neste ponto, não existe síntese líquida destes metabólitos a partir da acetil-CoA.

Os animais não podem realizar a síntese líquida de glicose a partir da acetil-CoA. Este é um conceito especialmente importante na compreensão da fome, diabetes e cetogênese, pois quantidades grandes de acetil-CoA são geradas a partir dos ácidos graxos, mas não rendem uma síntese líquida de

glicose. A “síntese líquida” é equivocada, pois foi claramente mostrado que os carbonos da acetil-CoA marcados são eventualmente incorporados na glicose, fazendo parecer que a glicose é sintetizada a partir da acetil-CoA. Entretanto, o investimento de 2 carbonos da acetil-CoA é dissipado pelas duas reações de descarboxilação no ciclo do TCA. A síntese líquida também significa que com o objetivo de operação contínua do ciclo do TCA, assim como para a produção de glicose, as reações anapleróticas devem fornecer carbonos para o ciclo em formas diferentes da acetil-CoA. Nesse caso, a maioria das reações anapleróticas imediatas envolve a produção de oxaloacetato a partir do piruvato (piruvato carboxilase) ou do aspartato (aspartato aminotransferase, AST, Cap. 19).

Succinil-CoA sintetase

A succinil-CoA sintetase (succinato tioquinase) catalisa a conversão da succinil-CoA rica em energia em succinato e CoA livre. A energia livre da ligação tioéster na succinil-CoA é conservada pela formação do GTP a partir do GDP e fosfato inorgânico (Pi). Como um composto de alta-energia serve como força impulsionadora para a síntese de GTP, essa é uma reação de fosforilação em nível de substrato, como as reações catalisadas pela fosfoglicerato quinase e piruvato quinase na glicólise (Cap. 12). O GTP é utilizado por enzimas tais como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) na gliconeogênese (Cap. 13), mas é também facilmente convertido em ATP pela enzima nucleosídeo difosfato quinase:

$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$$

As três reações seguintes no ciclo do TCA ilustram uma sequência comum no metabolismo para a introdução de um grupo carbonil em uma molécula:

- introdução de uma dupla ligação;
- adição de água na ligação dupla para formar um álcool;
- oxidação do álcool em uma cetona.

Esta mesma sequência ocorre na forma de intermediários ligados à enzima durante a conversão do citrato em α-cetoglutarato e na oxidação dos ácidos graxos.

Succinato desidrogenase

A succinato desidrogenase é uma flavoproteína contendo o grupo prostético FAD. Como descrito no Cap. 9, esta enzima está embebida na membrana mitocondrial interna onde faz parte do Complexo II (succinato-Q redutase). A reação envolve a oxidação do succinato a um ácido *trans*-dicarboxílico, o fumarato, com redução de FAD em $FADH_2$.

O BLOQUEIO DO MALONATO

A reação da malato desidrogenase teve um importante papel na elucidação da natureza cíclica do ciclo do TCA. Era conhecido que a adição de ácidos tricarboxílicos (citrato, aconitato) e que o α-cetoglutarato catalisava o metabolismo do piruvato – hoje nós sabemos que isto é o resultado da formação de quantidades catalíticas de oxaloacetato a partir destes intermediários. Em 1937, Krebs observou que o malonato, o ácido dicarboxílico de três carbonos homólogos ao succinato e inibidor competitivo da succinato desidrogenase, bloqueava o metabolismo do piruvato em preparações de músculos fatiados. Ele também mostrou que a inibição do metabolismo do piruvato pelo malonato levava não só ao acúmulo do succinato, mas também do citrato e α-cetoglutarato, sugerindo que o succinato era um produto do metabolismo do piruvato e que os ácidos tricarboxílicos poderiam ser intermediários neste processo. Surpreendentemente, o fumarato e o oxaloacetato também estimularam a oxidação do piruvato e levaram ao acúmulo de citrato e succinato durante o bloqueio do malonato, sugerindo que ácidos de três e quatro carbonos poderiam se combinar para formar ácidos tricarboxílicos. Os experimentos com fumarato indicaram que existiam duas vias entre o fumarato e o succinato, uma envolvendo o reverso da reação da succinato desidrogenase, que era inibida durante o bloqueio do malonato e a outra envolvendo a conversão de fumarato a succinato através de uma série de ácidos orgânicos. Estas observações, combinadas com a experiência de Krebs poucos anos antes na caracterização do ciclo da ureia (Cap. 19), o levaram a descrever o ciclo do TCA.

Fumarase

A fumarase adiciona estereoespecificamente água na ligação dupla *trans* do fumarato para formar um α-hidroxiácido, o L-malato.

Malato desidrogenase

A malato desidrogenase catalisa a oxidação do L-malato a oxaloacetato, produzindo NADH, completando uma volta inteira pelo ciclo do TCA. O oxaloacetato pode então reagir com a acetil-CoA, continuando o ciclo de reações.

O RENDIMENTO ENERGÉTICO DO CICLO DO ÁCIDO TRICARBOXÍLICO

Durante o curso do ciclo do TCA, cada mol de acetil-CoA gera coenzimas reduzidas suficientes para a síntese de ~9 moles de ATP pela fosforilação oxidativa.

$$3\ NADH \rightarrow 7,5\ ATP$$

$$1\ FADH_2 \rightarrow 1,5\ ATP$$

Juntamente com o GTP sintetizado pela fosforilação em nível de substrato na reação da succinil CoA sintetase (succinato tioquinase), um total de ~10 equivalentes de ATP está disponível por mol de acetil-CoA. Assim, o metabolismo completo de um mol de glicose, através da glicólise, do complexo piruvato desidrogenase e do ciclo do TCA, rende ~30-32 moles de ATP (Tabela 14.1). (O rendimento real de ATP depende da via de transporte dos equivalentes redox para a mitocôndria, ou seja, cerca de 5 moles de ATP pela lançadeira malato-aspartato e cerca de 3 moles de ATP pela lançadeira do glicerol fosfato (Cap. 9). Ao contrário, somente 2 moles de ATP (líquidos) são recuperados pela glicólise anaeróbica, na qual a glicose é convertida em lactato.

Tabela 14.1 Rendimento de ATP a partir da glicose durante o metabolismo oxidativo. O rendimento de ATP é apro-ximado porque ele é medido experimentalmente em mitocôndrias isoladas e existe alguma variabilidade. Estudos recentes sugerem que o rendimento real de ATP a partir de NADH e $FADH_2$ é aproximadamente de 2,5 e 1,5, respectivamente, forne-cendo aproximadamente 30-32 moles de ATP por mol de glicose. A oxidação da glicose em um calorímetro produz 2.870 kJ/mol (686 cal/mol), enquanto a síntese do ATP requer 31 kJ/mol (7,3 kcal/mol). O metabolismo aeróbico da glicose, portanto, term cerca de 40% de eficiência (2.870 kJ/mol glicose/31 kJ/mol de ATP = 93 moles, teoricamente, de ATP/mol glicose; 36/93 = 39%).

Energia da oxidação da glicose		
Reação	**Mecanismo**	**Moles ATP/mol Gic**
hexoquinase	fosforilação	−1
fosfofrutoquinase	fosforilação	−1
G3PDH	NADH, fosforilação oxidativa	+ 5 (+3)*
fosfoglicerato quinase	fosforilação em nível de substrato	+ 2
piruvato quinase	fosforilação em nível de substrato	+ 2
piruvato desidrogenase	NADH, fosforilação oxidativa	+ 5
isocitrato desidrogenase	NADH, fosforilação oxidativa	+ 5
α-cetoglutarato desidrogenase	NADH, fosforilação oxidativa	+ 5
succinil-CoA sintetase	fosforilação em nível de substrato (GTP)	+ 2
succinato desidrogenase	$FADH_2$, fosforilação oxidativa	+ 3

malato desidrogenase	NADH, fosforilação oxidativa	+5
TOTAL		**32 (30)***

* *Os elétrons provenientes do NADH citosólico podem resultar na síntese de cerca de 5 moles de ATP por mol de glicose pela lançadeira malato-aspartato, mas somente 3 moles por mol de glicose pela lançadeira do glicerol 3-fosfato* (Cap. 9).

REGULAÇÃO DO CICLO DO ÁCIDO TRICARBOXÍLICO

Existem vários níveis de controle do ciclo do TCA. Em geral, a atividade total do ciclo depende da disponibilidade de NAD^+ para as reações de desidrogenases. Esta, por sua vez, está ligada à taxa de consumo de NADH pelo sistema de transporte de elétrons, que depende da velocidade de utilização do ATP e da produção de ADP pelo metabolismo (Tabela 14.1). Assim, como o ATP é utilizado pelo trabalho metabólico, o ADP é produzido, o NADH é então consumido pelo sistema de transporte de elétrons para produção de ATP, e o NAD^+ é produzido. O ciclo do TCA é ativado, os combustíveis são consumidos e mais NADH é produzido e, portanto, mais ATP podem ser feitos. O nível mitocondrial de NAD^+ proporciona uma ligação entre o trabalho (utilização de ATP) e o consumo do combustível (Cap. 9).

Existem várias enzimas reguladoras que afetam a atividade do ciclo do TCA. A atividade do complexo piruvato desidrogenase e, portanto, o suprimento de acetil-CoA a partir da glicose, lactato e alanina, são regulados por modificações covalentes e alostéricas (Fig. 14.12). Os produtos da reação da piruvato desidrogenase, NADH e acetil-CoA, assim como ATP, agem como efetores alostéricos negativos do complexo enzimático. Além disso, o complexo piruvato desidrogenase está associado a quinases e fosfatases que modulam o grau de fosforilação dos resíduos de serina reguladores no complexo. NADH, acetil-CoA e ATP ativam a quinase, que fosforila e inativa o complexo enzimático. Ao contrário, quando estes três componentes estão em baixa concentração, o complexo enzimático é ativado alostericamente por desfosforilação pelas fosfatases. Este é um processo de regulação importante durante o jejum e a fome, quando a gliconeogênese é essencial para manter a concentração de glicose no sangue. O ativo metabolismo de gorduras durante o jejum leva ao aumento de NADH e acetil-CoA na mitocôndria, que leva à inibição da piruvato desidrogenase e bloqueia a utilização de carboidrato para o metabolismo energético no fígado. Nessas condições, o piruvato, a partir de intermediários como lactato e alanina, é direcionado para a gliconeogênese. Ao contrário, a insulina estimula a piruvato desidrogenase pela ativação da fosfatase em resposta aos carboidratos da dieta. Isto direciona os carbonos derivados de carboidratos para síntese de ácidos graxos via citrato sintase. O Ca^{2+} também afeta a atividade de fosfatase no CPD, em resposta ao aumento do Ca^{2+} intracelular durante a contração muscular (Cap. 20).

O oxaloacetato é necessário para a entrada de acetil-CoA no ciclo do TCA, mas, às vezes, a disponibilidade do oxaloacetato parece regular a atividade do ciclo. Isto ocorre especialmente durante o jejum quando os níveis de ATP e NADH, derivados do metabolismo de gorduras, estão aumentados na mitocôndria. O aumento de NADH desloca o equilíbrio de malato:oxaloacetato na direção de malato, direcionando os intermediários do ciclo do TCA para o malato, que é exportado para o citosol para a gliconeogênese (Cap. 13). Enquanto isso, a acetil-CoA derivada do metabolismo de gorduras é direcionada para a síntese de corpos cetônicos devido à falta de oxaloacetato, regenerando CoASH e levando a um aumento dos corpos cetônicos no plasma durante o jejum (Cap. 15).

A isocitrato desidrogenase é a principal enzima reguladora no ciclo do TCA. Ela está sujeita à inibição alostérica pelo ATP e NADH e à estimulação pelo ADP e NAD^+. Durante o consumo de uma dieta rica em carboidratos sob condições de repouso, a demanda por ATP está diminuída e o nível de intermediários derivados dos carboidratos aumenta. Sob estas circunstâncias, o aumento do

nível de insulina estimula o complexo piruvato desidrogenase e o acúmulo de ATP, e NADH inibe a isocitrato desidrogenase, causando o acúmulo mitocondrial do citrato. O citrato é então exportado para o citosol para síntese de ácidos graxos, que são exportados do fígado para o armazenamento no tecido adiposo como triacilgliceróis. Com um aumento da demanda energética, por exemplo, durante a contração muscular, o NAD^+ e o ADP acumulam, e estimulam a isocitrato desidrogenase.

A indução e a repressão, assim como a proteólise de enzimas, tais como a piruvato carboxilase e aquelas do complexo piruvato desidrogenase e do ciclo do TCA, também desempenham um papel regulador importante. De fato, todo o ciclo do TCA e as enzimas associadas são sintetizados no citoplasma e transportados através de uma complexa série de etapas para mitocôndria. A regulação pode ocorrer no nível da tradução, da transcrição e do transporte intracelular. A dieta, por exemplo, é conhecida por controlar a expressão de quatro quinases de piruvato desidrogenase; uma delas é induzida em resposta a uma dieta rica em gorduras e é reprimida em resposta a uma dieta rica em carboidratos. Infelizmente, a regulação do ciclo do TCA nos níveis genéticos e de transportes não é atualmente ainda bem conhecida, embora seja clara a sua importância para a compreensão da patogênese de vários problemas de saúde contemporâneos, tais como o diabetes e a obesidade.

REAÇÕES ANAPLERÓTICAS (“PREENCHIMENTO”)

Conforme mostrado na Figura 14.1, muitos intermediários do ciclo do TCA participam nos processos de biossíntese, que esgotam os intermediários do ciclo do TCA. Por exemplo, a síntese de 1 mol de heme necessita de 8 moles de succinil-CoA. O ciclo do TCA poderia cessar sua função se os intermediários não fossem restabelecidos, porque a acetil-CoA não produz uma síntese líquida de intermediários do ciclo do TCA. As reações anapleróticas (de preenchimento) abastecem o ciclo do TCA com outros intermediários, que não acetil-CoA, para manter a atividade do ciclo. A piruvato carboxilase é um exemplo de uma enzima que catalisa uma reação anaplerótica. Ela converte o piruvato em oxaloacetato, que é necessário para a gliconeogênese. A enzima málica no citoplasma converte o piruvato em malato, gerando NADPH para a síntese de lipídios. O α-cetoglutarato pode ser produzido através de uma reação de aminotransferase a partir do glutamato, assim como pela reação da glutamato desidrogenase. Vários outros aminoácidos “glicogênicos” (Cap. 19) podem também servir como fontes de piruvato ou de intermediários do ciclo do TCA, garantindo que o ciclo nunca seja interrompido por uma falta de intermediários.

Resumo

Localizado na mitocôndria, o ciclo do TCA está intimamente associado ao complexo piruvato desidrogenase, ao sistema de transporte de elétrons e a outras vias, que funcionam como uma unidade altamente coordenada. O ciclo do TCA é uma via central, comum, através da qual os combustíveis são oxidados, e também participa nas principais vias de biossíntese. No seu papel oxidativo, os seus principais produtos são: GTP e as coenzimas reduzidas NADH e $FADH_2$, que fornecem grandes quantidades de energia livre para a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa. No seu papel biossintético, ele fornece intermediários essenciais para a síntese de glicose, ácidos graxos, aminoácidos e heme, assim como o ATP necessário para sua biossíntese. A atividade do ciclo do TCA é rigorosamente regulada pelo suprimento de substrato, por efetores alostéricos e pelo controle da expressão gênica, de tal modo que o consumo de combustível esteja coordenado com a produção de energia.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. No beribéri, a vitamina tiamina é deficiente. Quais os intermediários que poderiam se acumular e por quê?

2. Tomando como base as taxas de consumo de oxigênio, que tecidos poderiam ser mais criticamente afetados por defeitos genéticos em enzimas do ciclo do TCA?

3. Compare a regulação do complexo piruvato desidrogenase com a regulação das enzimas citosólicas pelas reações de fosforilação e desfosforilação.

4. Avalie as consequências das deficiências nas enzimas do ciclo do TCA, tais como a succinato desidrogenase, a fumarase ou a malato desidrogenase.

Leituras sugeridas

De Meirleir L. Defects of pyruvate metabolism and the Krebs cycle. *J Child Neurol*. 2002;17(suppl 3):3S26-S33. discussion 3S33–34.

Haggie PM, Verkman AS. Diffusion of tricarboxylic acid cycle enzymes in the mitochondrial matrix *in vivo*. Evidence for restricted mobility of a multienzyme complex. *J Biol Chem*. 2002;277:40782-40788.

Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. 2007;130:797-810.

McCammon MT, Epstein CB, Przybyla-Zawislak B, McAlister-Henn L, Butow RA. Global transcription analysis of Krebs tricarboxylic acid cycle mutants reveals an alternating pattern of gene expression and effects on hypoxic and oxidative genes. *Mol Biol Cell*. 2003;14:958-972.

Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem*. 2002;277:30409-30412.

Sharma N, Okere IC, Brunengraber DZ, et al. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity and citric acid cycle intermediates during high cardiac power generation. *J Physiol*. 2005;562:593-603.

Sugden MC, Holness MJ. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol*. 2003;284:E855-E862.

Walton ME, Ebert D, Haller RG. Relative rates of anaplerotic flux in rested and contracted rat skeletal muscle measured by 13C NMR spectroscopy. *J Physiol*. 2003;548:541-548.

Sites

Ciclo do TCA:

- www.johnkyrk.com/krebs.html
- www.wiley.com/legacy/college/boyer/0470003790/animations/tca/tca.htm

Causas da doença de Leigh. www.ninds.nih.gov/health_and_medical/disorders/leighsdisease_doc.htm.

Listagem de desordens genéticas Listagem de desordens genéticas. www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim-SEARCH:KREBSCYCLE.

Metabolismo Oxidativo de Lipídios no Fígado e no Músculo

J.W. Baynes

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever o processo da ativação e do transporte dos ácidos graxos para a mitocôndria, para seu catabolismo.
- Reconhecer a sequência de reações mitocondriais envolvidas na oxidação dos ácidos graxos.
- Descrever as características gerais das vias de oxidação dos ácidos graxos insaturados, dos ácidos graxos com cadeias ímpares e daqueles com cadeia ramificada.
- Explicar as bases da via da cetogênese e identificar os principais intermediários e produtos desta via.
- Descrever o mecanismo pelo qual a ativação hormonal da lipólise no tecido adiposo é coordenado com a ativação da gliconeogênese no fígado durante o jejum.

INTRODUÇÃO

Normalmente as gorduras são a principal fonte de energia para o fígado e para o músculo, bem como para os tecidos humanos em geral, exceto para os eritrócitos e o cérebro. Os triacilgliceróis são estocados e transportados sob a forma de gordura; os ácidos graxos são a fonte imediata de energia. Eles são liberados do tecido adiposo, transportados em associação à albumina plasmática e distribuídos às células para o metabolismo. O catabolismo dos ácidos graxos ocorre inteiramente por oxidação; após terem sido transportados para dentro do citoplasma, a sua oxidação pode ocorrer tanto nos peroxissomos como nas mitocôndrias, principalmente por um ciclo de reações conhecido como β-oxidação. São liberados dois carbonos de cada vez da extremidade carboxil terminal do ácido graxo; os principais produtos finais são a acetil-coenzima A (acetil-CoA) e as formas reduzidas dos nucleotídeos, $FADH_2$ e NADH. No músculo, o acetil-CoA é metabolizado por meio do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e da fosforilação oxidativa para produzir o ATP. No fígado, o acetil-CoA é amplamente convertido em corpos cetônicos (cetogênese), os quais são derivados lipídicos hidrossolúveis que, como a glicose, são exportados do fígado para serem utilizados em outros tecidos. O metabolismo das gorduras é principalmente controlado pela taxa de hidrólise dos triacilgliceróis (lipólise) no tecido adiposo e regulado por mecanismos hormonais envolvendo a insulina, o glucagon, a epinefrina e o cortisol. Estes hormônios coordenam o metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas em todo o organismo (Cap. 21).

ATIVAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E SEU TRANSPORTE PARA A MITOCÔNDRIA

Os ácidos graxos não existem livres no organismo – os sais ou ácidos graxos são sabões e dissolveriam as membranas celulares. No sangue, os ácidos graxos estão ligados à albumina, que está presente no plasma na concentração de quase 0,5 mmol/L (35 mg/mL). Cada molécula de albumina pode ligar seis a oito moléculas de ácidos graxos. No citosol, os ácidos graxos estão ligados a várias proteínas e enzimas ligadoras dos ácidos graxos e enzimas. Como passo inicial para o seu catabolismo, os ácidos graxos são ativados em seu derivado CoA, usando trifosfato de adenosina (ATP) como fonte de energia (Fig. 15.1). O grupo carboxila é primeiro ativado a um intermediário ligado à enzima, o aciladenilato de alta energia, formado pela reação do grupo carboxila do ácido graxo com o ATP. O grupo acil é então transferido para a CoA pela mesma enzima; a acil-CoA sintetase. Esta enzima é conhecida como ácido graxo tioquinase, porque o ATP é consumido na formação da ligação tioéster do acil-CoA.

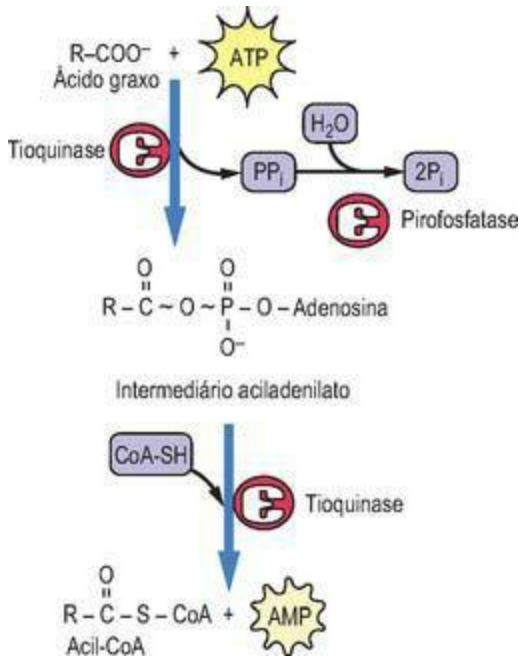


Fig. 15.1 Ativação dos ácidos graxos pela acil-CoA sintetase (tioquinase). O ATP forma um aciladenilato intermediário ligado à enzima, que é liberado pela CoASH para formar a acil-CoA. AMP, monofosfato de adenosina; CoASH, coenzima A; PPi, pirofosfato inorgânico.

O comprimento dos ácidos graxos determina onde eles serão ativados pela CoA

Os ácidos graxos de cadeia curta e de cadeia média (Tabela 15.1) podem cruzar a membrana mitocondrial por difusão passiva, sendo ativados em seus derivados CoA no interior da mitocôndria. Os ácidos graxos de cadeia muito longa provenientes da dieta são encurtados para ácidos graxos de cadeia longa nos peroxissomos. Os principais componentes dos triacilgliceróis estocados e das gorduras da dieta são os ácidos graxos de cadeia longa. Eles são ativados a derivados CoA no citoplasma e transportados para a mitocôndria pelo sistema transportador da carnitina.

Tabela 15.1 Metabolismo das quatro classes de ácidos graxos. Compare com a Tabela 3.20.

Classe por tamanho	Número de carbonos	Local de catabolismo	Transporte pela membrana
Cadeia curta	2-4	mitocôndria	difusão
Cadeia média	4-12	mitocôndria	difusão
Cadeia longa	12-20	mitocôndria	ciclo da carnitina
Cadeia muito longa	>20	peroxissomos	desconhecido

O sistema transportador da carnitina

A CoA é um derivado nucleotídeo polar e grande, por isso, não pode atravessar a membrana mitocondrial interna. Assim, para o transporte dos ácidos graxos de cadeia longa, o ácido graxo é primeiro transferido para uma molécula pequena, a carnitina, pela carnitina palmitoiltransferase-I (CPT-I), localizada na membrana mitocondrial externa. Um transportador acil-carnitina ou translocase na membrana mitocondrial interna torna possível a transferência de acil-carnitina para dentro da mitocôndria, em que a CPT-II regenera a acil-CoA, liberando a carnitina livre. O transporte da carnitina (Fig. 15.2) opera por um mecanismo antiporte no qual a carnitina livre e o derivado acil-carnitina movem-se em direções opostas através da membrana mitocondrial interna. Este transporte é um ponto importante da regulação da oxidação dos ácidos graxos. Conforme discutido no próximo capítulo, o transporte da carnitina é inibido pelo malonil-CoA, após a ingestão de refeições ricas em carboidratos. O malonil-CoA previne o ciclo fútil em que ácidos graxos recém-sintetizados seriam oxidados na mitocôndria e promove a sua exportação do fígado para a estocagem no tecido adiposo.

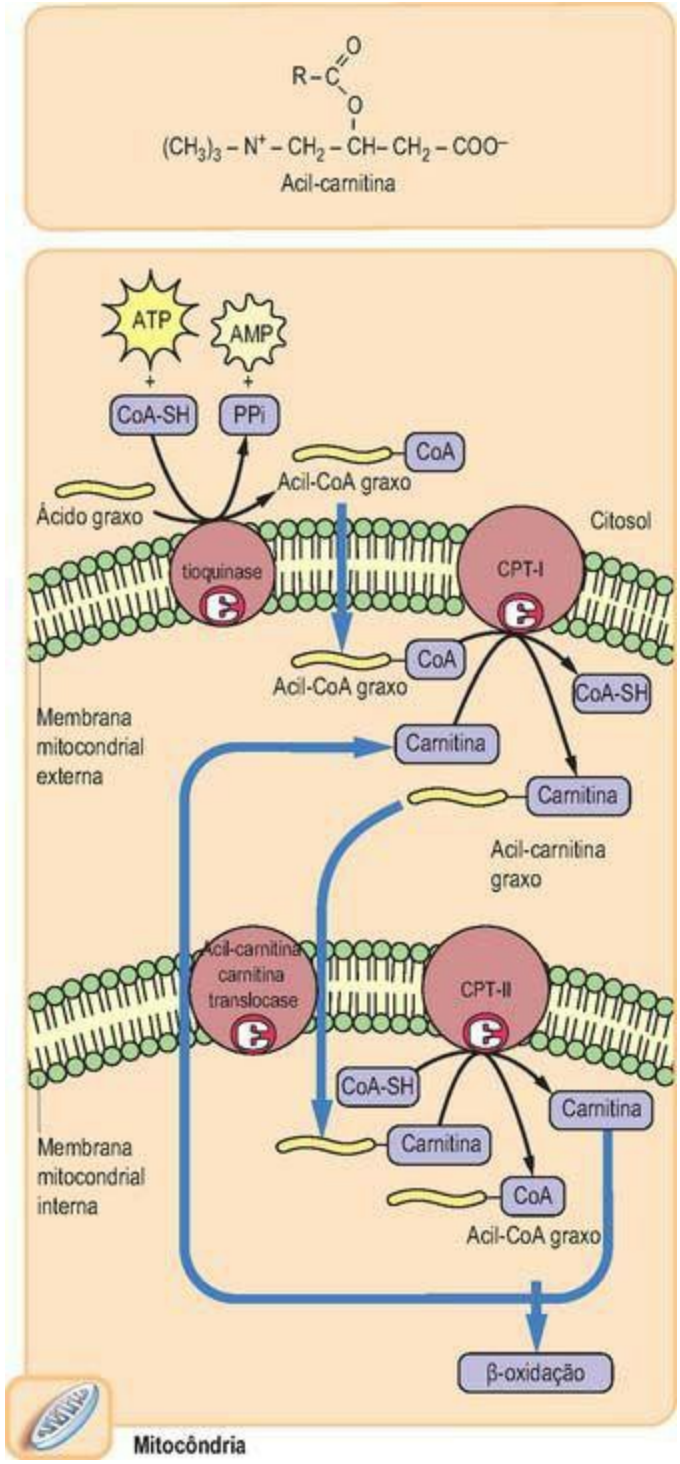


Fig. 15.2 Transporte dos ácidos graxos de cadeia longa para dentro da mitocôndria. Os três componentes da via da carnitina incluem as CPTs extra e intramitocondriais e a acil-carnitina carnitina translocase.

OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

β-oxidação mitocondrial

Os acil-CoA graxos são oxidados por um ciclo de reações que envolvem a oxidação do carbono β para uma cetona; daí a terminologia β-oxidação (Figs. 15.3 e 15.4). A oxidação é seguida pela clivagem entre os carbonos α e β pela tiolase. Durante cada ciclo são formados um mol de acetil-CoA, $FADH_2$ e NADH, bem como um acil-CoA graxo com dois átomos de carbono a menos. Para um ácido graxo com 16 carbonos, como o palmitato, o ciclo é repetido sete vezes, produzindo 8 moles de acetil-CoA (Fig. 15.3, Tabela 15.1), mais 7 moles de $FADH_2$ e 7 moles de NADH + H^+. Este processo ocorre na mitocôndria e os nucleotídeos reduzidos são utilizados diretamente para a síntese do ATP pela fosforilação oxidativa (Tabela 15.2).

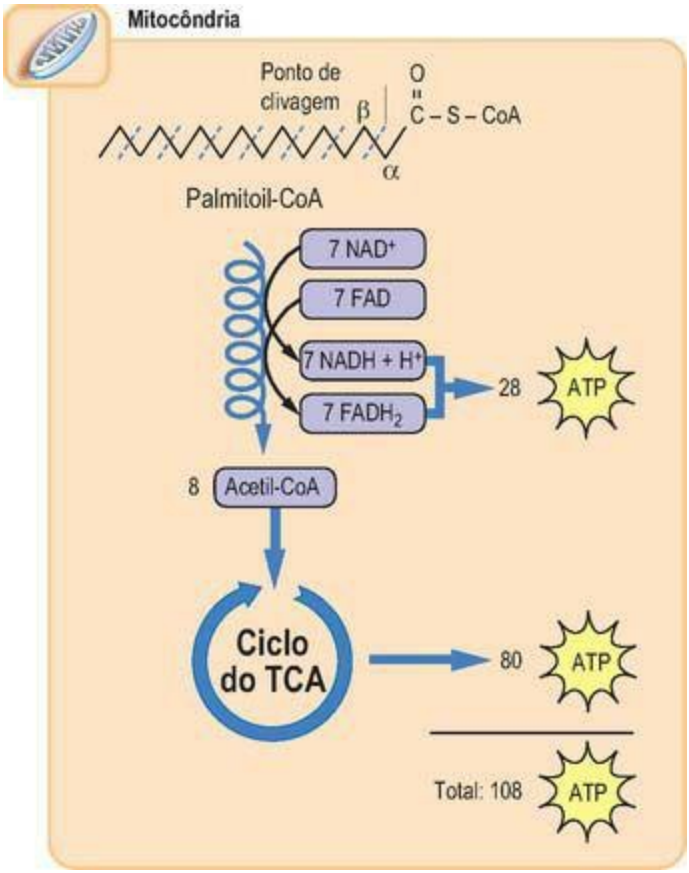


Fig. 15.3 Visão geral da β-oxidação do palmitato. Em um ciclo de reações, os carbonos da acil-CoA são liberados em unidades de dois carbonos acetil-CoA. O rendimento de 28 ATP da β-oxidação é aproximadamente equivalente à oxidação completa da glicose. No fígado, as unidades de acetil-CoA são então usadas para a síntese dos corpos cetônicos, e, em outros tecidos, são metabolizadas no ciclo do TCA para formar ATP. A oxidação completa do palmitato libera um total de 106 moles de ATP após a correção de 2 moles equivalentes ao investido na reação da tioquinase. A produção total de ATP por grama de palmitato é em torno de duas vezes à da glicose pela mesma unidade, já que a glicose é parcialmente oxidada com relação ao palmitato. Por esta razão, o valor calórico das gorduras é aproximadamente o dobro daquele dos açúcares (Tabela 15.2).

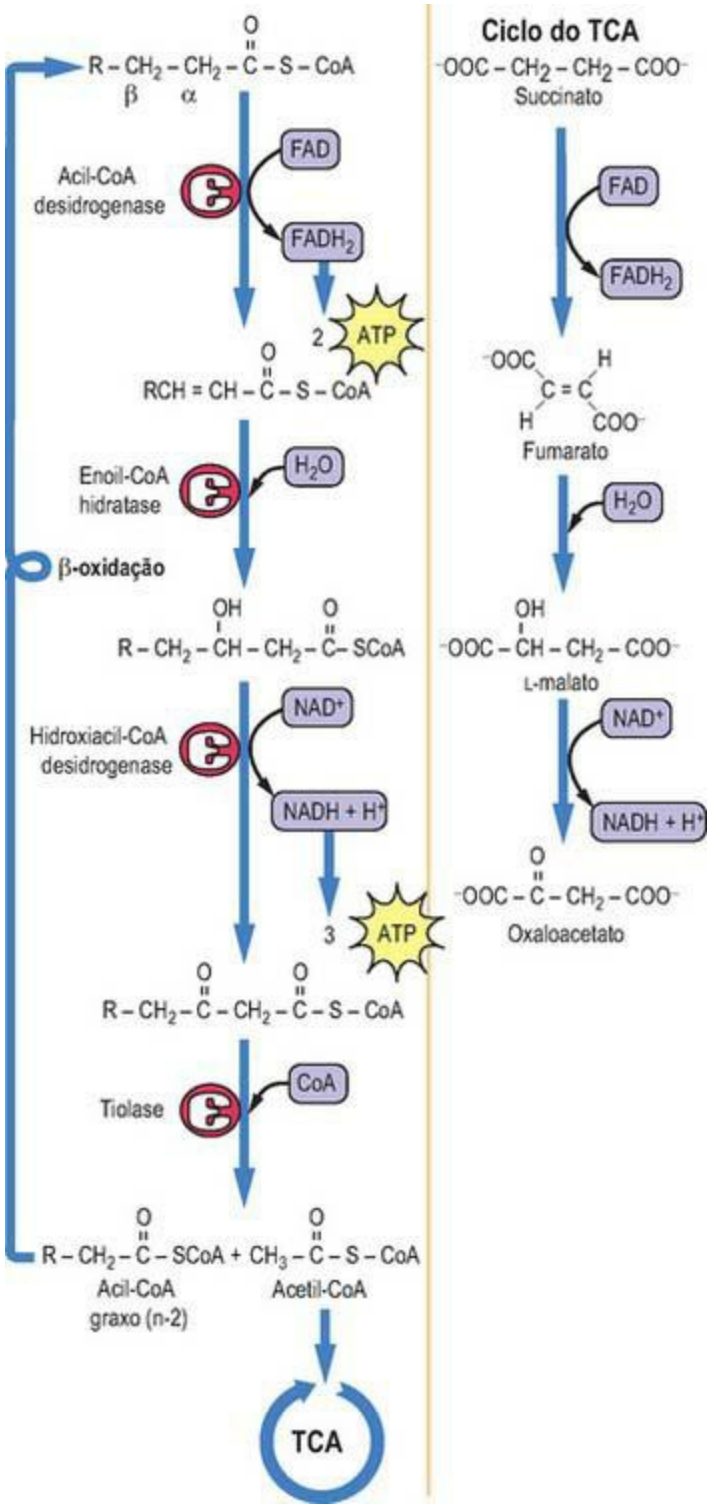


Fig. 15.4 **β-oxidação dos ácidos graxos.** A oxidação ocorre em uma série de etapas no carbono β para produzir um grupo ceto. A tiolase cliva o derivado resultante da β-cetoacil-CoA para originar a acetil-CoA e um ácido graxo com dois átomos de carbono a menos, que então reinicia a cascata da β-oxidação. Note a similaridade entre estas reações com aquelas do ciclo do TCA, apresentadas à direita.

Tabela 15.2 **Comparação dos rendimentos energéticos da glicose e do palmitato.** Compare com a Tabela 9.1

Substrato	Peso molecular	Rendimento líquido em ATP (mol/mol)	ATP (mol/g)	Valor calórico Cal/g (KJ)
Glicose	180	36–38	0,2	4 (17)
Palmitato	256	129	0,5	9 (37)

As quatro etapas do ciclo da β-oxidação são apresentadas em detalhe na Figura 15.3. Note a similaridade entre a sequência destas reações e aquelas do succinato e do oxaloacetato no ciclo do TCA. Em comum com a succinato desidrogenase, a acil-CoA desidrogenase, uma proteína integral da membrana interna da mitocôndria, utiliza o grupo prostético FAD como coenzima. Mesmo a geometria *trans* do fumarato e a configuração estereoquímica do L-malato no ciclo do TCA assemelham-se à gemometria *trans* dos intermediários trans-enoil-CoA e L-hidroxiacil-CoA, intermediários da β-oxidação. A última etapa do ciclo da β-oxidação é catalisada pela tiolase, que aprisiona a energia obtida da clivagem carbono-carbono como acil-CoA, permitindo que o ciclo continue sem a necessidade de reativação do ácido graxo. O ciclo prossegue até que o ácido graxo inteiro tenha sido convertido em acetil-CoA, o intermediário comum da oxidação de carboidratos e lipídios.

CONSEQUÊNCIAS DA DEFICIÊNCIA DA OXIDAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA MÉDIA

Deficiência na acil-CoA desidrogenase

A acil-CoA desidrogenase não é uma única enzima, mas uma família de enzimas com especificidade para a oxidação conforme o comprimento da cadeia dos ácidos graxos de cadeias curta, média e longa; os ácidos graxos são transferidos de uma enzima para outra durante as reações de encurtamento da cadeia da β-oxidação. A deficiência da acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD) é uma doença autossômica recessiva caracterizada por hipoglicemia hipocetótica. Esta se apresenta na infância e se caracteriza por altas concentrações de ácidos carboxílicos de cadeia média, acil-carnitinas e acil-glicinas no plasma e na urina. A hiperamonemia também pode estar presente como um resultado do dano hepático. As concentrações mitocondriais hepáticas dos derivados da acil-CoA de cadeia média também são aumentadas, limitando a β-oxidação e a reciclagem da CoA durante a cetogênese. A incapacidade de metabolizar as gorduras durante o jejum é uma ameaça à vida por limitar a gliconeogênese e causar hipoglicemia. A deficiência da MCAD é tratada pela alimentação frequente, evitando o jejum, e pela suplementação de carnitina. As deficiências das desidrogenases de ácidos graxos de cadeias curta e longa possuem características clínicas similares.

Catabolismo dos ácidos graxos nos peroxissomos

Os peroxissomos são organelas subcelulares encontradas em todas as células nucleadas. Eles estão envolvidos na oxidação de um número de substratos, incluindo urato e ácidos graxos de cadeias ramificadas longa ou muito longa. Eles são o principal local da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na célula e contabilizam cerca de 20% do oxigênio consumido nos hepatócitos. Os peroxissomos possuem sistema transportador de carnitina e conduzem a β-oxidação por via similar à da mitocôndria, exceto pelo fato de a acil-CoA desidrogenase ser uma oxidase, antes de uma desidrogenase. O montante de $FADH_2$ produzido nesta e em outras reações de oxidação, incluindo α- e ω-oxidação, é oxidado pelo oxigênio molecular, produzindo H_2O_2. Esta via é menos eficiente energeticamente do que a β-oxidação mitocondrial porque não é produzido ATP pela fosforilação oxidativa. As enzimas dos peroxissomos não podem oxidar ácidos graxos de cadeia curta, logo, produtos como o butanoil-, hexanoil- e octanoil-carnitina são exportados para posterior catabolismo na mitocôndria.

Os fibratos são uma classe de fármacos hipolipidêmicos que age induzindo a proliferação de peroxissomos no fígado. A síndrome de Zellweger, resultante de defeitos na importação de enzimas para os peroxissomos, é uma doença que atinge múltiplos órgãos e leva à morte, usualmente, por volta dos seis meses de idade; é caracterizada pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa nos tecidos neurais, muito provavelmente pela impossibilidade de metabolizar os ácidos graxos nesse tecido. Os peroxissomos também possuem funções anabólicas. Acredita-se que estes tenham papel na produção de acetil-CoA para biossíntese de colesterol e poli-isoprenoides (Cap. 17), e que contenham a di-hidroxiacetona-fosfatase aciltransferase, requerida para a síntese de plasmalogênios (Cap. 27).

Quando os ácidos graxos insaturados são oxidados liberam menos $FADH_2$

Os ácidos graxos insaturados já são parcialmente oxidados, assim, menos $FADH_2$ e correspondentemente menos ATP são produzidos na sua oxidação. As duplas ligações dos ácidos graxos poli-insaturados possuem uma geometria *cis* e ocorrem em intervalos de três carbonos, enquanto os intermediários da β-oxidação possuem simetria *trans* e suas reações ocorrem em etapas de dois carbonos. Desta maneira, o metabolismo dos ácidos graxos insaturados requer várias enzimas adicionais, tanto para mover a posição quanto para alterar a geometria das duplas ligações.

Os ácidos graxos de cadeia ímpar produzem succinil-CoA do propionil-CoA

A oxidação dos ácidos graxos com número ímpar de carbonos ocorre da carboxila terminal, da mesma maneira que a dos ácidos graxos normais, exceto o propionil-CoA, que é formada pela última clivagem da reação da tiolase. A propionil-CoA é convertida em succinil-CoA por um processo de múltiplas etapas envolvendo três enzimas e as vitaminas biotina e cobalamina (Fig. 15.5). A succinil-CoA entra diretamente no ciclo do TCA.

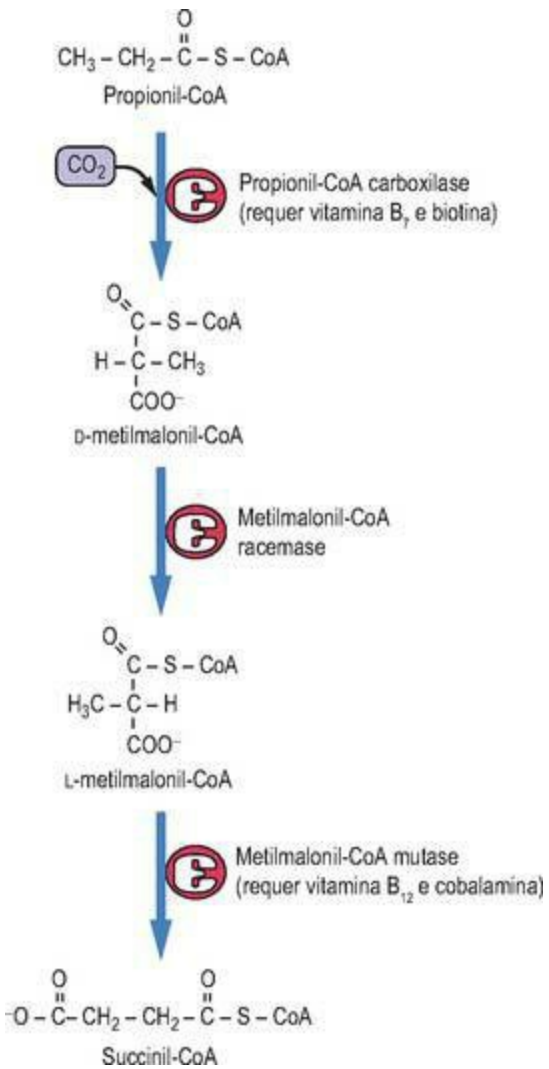


Fig. 15.5 Metabolismo do propionil-CoA para succinil-CoA. O propionil-CoA dos ácidos graxos de cadeia com número ímpar de átomos de carbono é a fonte minoritária de carbonos para a gliconeogênese. O intermediário metilmalonil-CoA também é produzido durante o catabolismo dos ácidos graxos de cadeia ramificada. Defeitos da metilmalonil-CoA mutase ou deficiência de vitamina B_{12} ocasionam a acidúria metilmalônica.

Os ácidos graxos ramificados devem ser catabolizados a acetil-CoA e propionil-CoA da α-oxidação

Ácidos fitânicos são lipídios poli-isoprenoides de cadeia ramificada encontrados na clorofila de plantas. Não é possível oxidar o carbono β do ácido fitânico para uma cetona, porque este é um ponto de ramificação. A primeira e essencial etapa no catabolismo dos ácidos fitânicos é a α-oxidação microssomal para ácido pristânico, liberando o carbono α como dióxido de carbono. Após este ponto, conforme mostrado na Figura 15.6, o acetil-CoA e o propionil-CoA são alternativamente liberados e em igual quantidade. A doença de Refsum é uma desordem neurológica rara, caracterizada pelo acúmulo de ácido fitânico nos tecidos nervosos como resultado de um defeito genético da α-oxidação.

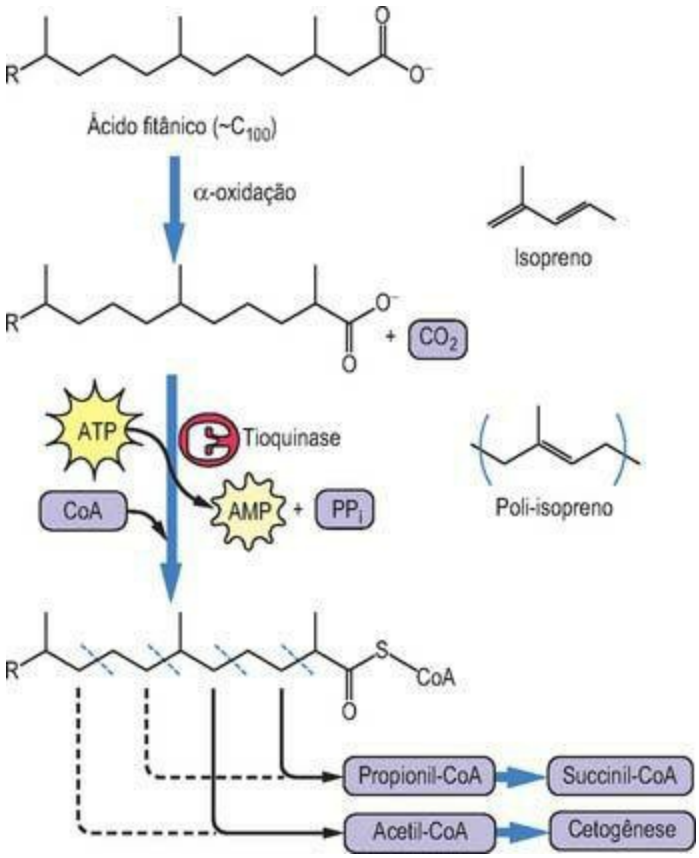


Fig. 15.6 α-oxidação dos ácidos fitânicos de cadeia ramificada. O primeiro carbono dos ácidos fitânicos é removido como dióxido de carbono. Nos ciclos subsequentes da β-oxidação, são liberados alternativamente o acetil-CoA e o propionil-CoA.

CETOGÊNESE – UMA VIA METABÓLICA EXCLUSIVA DO FÍGADO

A gliconeogênese no jejum e na inanição

O fígado utiliza os ácidos graxos como fonte de energia para a gliconeogênese durante o jejum e a inanição. As gorduras são uma fonte rica de energia e, em condições de jejum ou inanição, as concentrações de ATP e NADH derivadas das gorduras são elevadas nas mitocôndrias hepáticas, o que inibe a reação da isocitrato desidrogenase e muda o equilíbrio oxaloacetato-malato no sentido do malato. Os intermediários do ciclo do TCA que são formados dos aminoácidos liberados do músculo, como parte da resposta ao jejum e à inanição (Cap. 21), são convertidos em malato no ciclo do TCA, e, posteriormente, o malato sai da mitocôndria para participar da gliconeogênese (Cap. 13). O baixo nível de oxaloacetato resultante na mitocôndria hepática limita a atividade do ciclo do TCA, o que leva à incapacidade de metabolizar eficientemente o acetil-CoA no ciclo do TCA. Embora o fígado possa obter energia suficiente para suportar a gliconeigênese apenas pelas enzimas da β-oxidação, que geram ambos $FADH_2$ e NADH, o acúmulo de acetil-CoA, com concomitante depleção de CoA, limita a β-oxidação.

DEFEITOS NA β-OXIDAÇÃO

Acidúria dicarboxílica e β-oxidação dos ácidos graxos

Vários distúrbios do catabolismo lipídico, incluindo as alterações no transporte da carnitina, deficiências na acil-CoA desidrogenase e a síndrome de Zellweger (um defeito na biogênese dos peroxissomos) estão associados ao aparecimento de ácidos dicarboxílicos de cadeia média na urina. Quando a β-oxidação dos ácidos graxos é prejudicada, estes são oxidados, um carbono por vez, pela α-oxidação ou do carbono ω pelas hidroxilases e desidrogenase microssomais dependentes de citocromo $P\text{-}_{450}$. Estes ácidos dicarboxílicos são substratos para a β-oxidação peroxissomal, que continua até o nível de ácidos dicarboxílicos de cadeia curta, os quais são excretados do peroxissomo, aparecendo, por fim, na urina.

O que o fígado faz com o excesso de acetil-CoA que se acumula no jejum ou na inanição?

O problema de lidar com o excesso de acetil-CoA é crítico, porque o CoA está presente somente em quantidades catalíticas nos tecidos e o CoA livre é requerido para iniciar e continuar o ciclo da β-oxidação que é a primeira fonte de ATP no fígado. Para reciclar o acetil-CoA, o fígado utiliza uma via conhecida como cetogênese, na qual a CoA livre é regenerada e o grupo acetato aparece no sangue sob a forma de três derivados lipídicos hidrossolúveis: acetoacetato, β-hidroxiburiato e acetona. A via de formação destes "corpos cetônicos" (Fig. 15.7) envolve a síntese e a decomposição da hidroximetilglutaril (HMG)-CoA na mitocôndria. O fígado é o único órgão que contém a HMG-CoA sintase e liase, mas é deficiente em enzimas necessárias para o metabolismo dos corpos cetônicos, o que explica a exportação deles para o sangue.

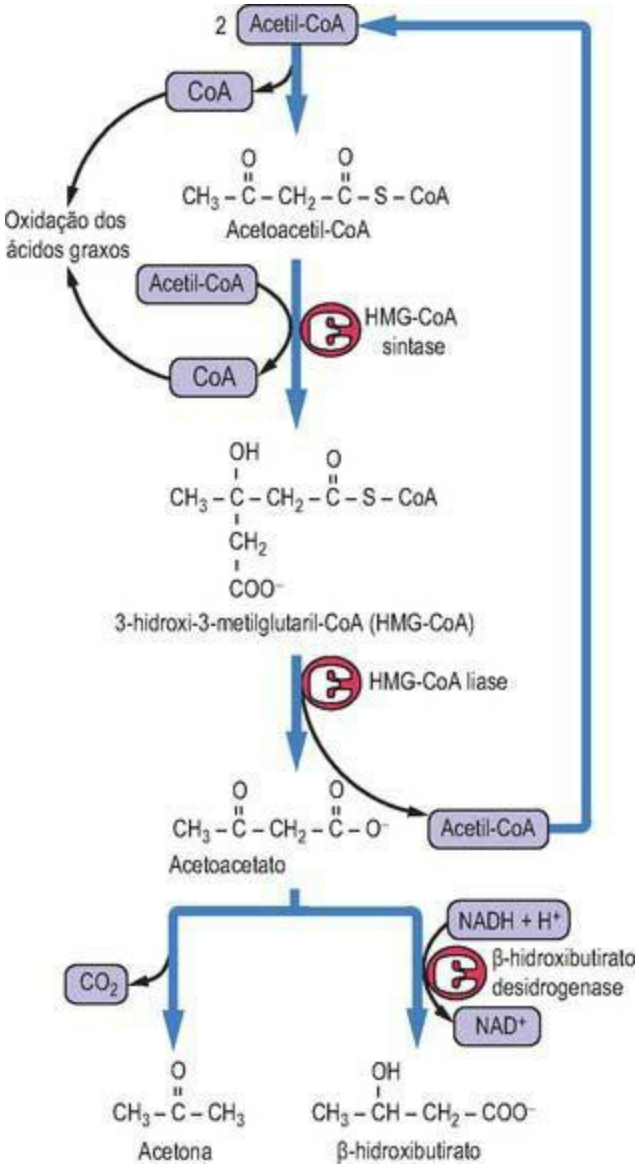


Fig. 15.7 Via da cetogênese do acetil-CoA. A cetogênese gera corpos cetônicos da acetil-coA, liberando o CoA para participar da β-oxidação. As enzimas envolvidas, a HMG-CoA sintase e a liase, são exclusivas dos hepatócitos; a HMG-CoA é um intermediário essencial. O produto inicial é o ácido acetoacético, o qual pode ser produzido enzimaticamente para β-hidroxibutirato pela β-hidroxibutirato desidrogenase, ou pode ser espontaneamente (não enzimaticamente) decomposto em acetona, que pode ser excretada na urina ou expirada pelos pulmões.

Os corpos cetônicos são distribuídos para os tecidos extra-hepáticos, incluindo o músculo esquelético e o músculo cardíaco, onde eles são convertidos em derivados da CoA para o metabolismo (Fig. 15.8). Os corpos cetônicos são uma fonte eficiente de energia (Tabela 15.3) durante o jejum e a inanição, e parecem ser utilizados nos músculos de acordo com a sua concentração plasmática. Eles são utilizados no músculo esquelético e cardíaco proporcionalmente a sua concentração plasmática. Durante a inanição, o cérebro também passa a fazer uso dos corpos cetônicos para obter mais de 50% de suas necessidades energéticas, poupando glicose e reduzindo a demanda da degradação das proteínas musculares para a gliconeogênese (Cap. 21).

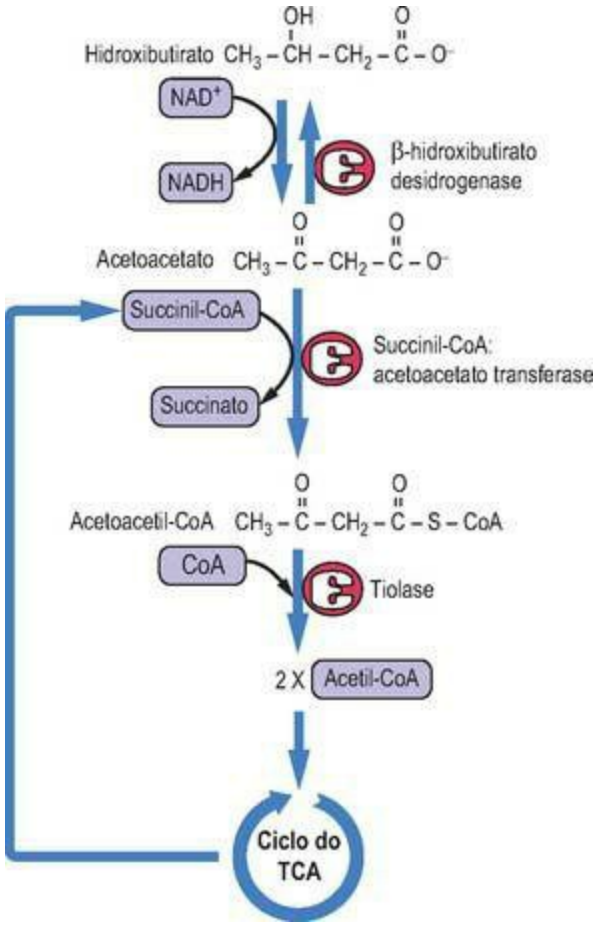


Fig. 15.8 Catabolismo dos corpos cetônicos nos tecidos periféricos. Succinil-CoA: acetoacetato-CoA transferase ativa a transferência do acetoacetato para acetoacetil-CoA. Uma enzima do tipo tioquinase também pode agir diretamente, ativando o acetoacetato em alguns tecidos.

Tabela 15.3 Concentração plasmática de ácidos graxos e corpos cetô-nicos em diferentes estados nutricionais.

Substrato	Concentração plasmática (mmol/L)		
	Normal	Jejum	Fome
Ácidos graxos	0,6	1,0	1.5
Acetoacetato	<0,1	0,2	1–2
β-Hidroxibutirato	<0,1	1	5–10

PRESENÇA DE CORPOS CETÔNICOS NA URINA (CETONÚRIA) E OS PROGRAMAS DE PERDA DE PESO

O aparecimento de corpos cetônicos na urina é uma indicação do metabolismo ativo de gorduras e da gliconeogênese. A cetonúria também pode ocorrer na associação de uma dieta rica em gorduras e pobre em carboidratos. Alguns programas para perda de peso encorajam a redução gradual de carboidratos e da ingestão calórica total até o aparecimento dos corpos cetônicos da urina (medido

com Keto-Stix®). As pessoas em dieta são incitadas a manter este nível de ingetão calórica, checando regularmente a presença de corpos cetônicos na urina para confirmar o consumo de gordura corporal.

Comentário. O Keto-Stix® e os testes "químicos secos" similares são tiras de testes adequadas para corpos cetônicos presentes na urina. Eles contêm um reagente químico, tal como o nitroprussiato, que reage com o acetoacetato na urina para formar uma coloração de lavanda, graduada numa escala com um valor máximo de "+4". Uma reação "+1" (que representa 5-10 mg de corpos cetônicos /100 mL) ou "+2" (10-20 mg/100 mL) foi estabelecida como objetivo para assegurar o metabolismo contínuo de gorduras e, dessa forma, a perda de peso. Atualmente este tipo de dieta é desencorajado, pois o aparecimento de corpos cetônicos na urina indica maiores concentrações no plasma, o que pode causar acidose metabólica.

DEFEITOS NA CETOGÊNESE

A cetogênese como resultado de uma deficiência no metabolismo da carnitina

A apresentação clínica da deficiência no metabolismo da carnitina ocorre na infância e é frequentemente uma ameaça à vida. As características marcantes incluem a hipoglicemia hipocetótica, hiperamonemia e concentração alterada da carnitina livre no plasma. São comuns danos hepáticos, miocardiopatia e fraqueza muscular.

Comentário. A carnitina é sintetizada a partir da lisina e do α-cetoglutamato, principalmente no fígado e nos rins, estando normalmente presente no plasma em uma concentração de cerca de 50 μmol/L (1 mg/dL). Existem sistemas de alta afinidade para captar a carnitina na maioria dos tecidos, incluindo os rins, que reabsorvem a carnitina do filtrado glomerular, limitando a sua excreção na urina. Deficiências homozigóticas no transporte da carnitina, dos CPTs-I e II e da translocase resultam em defeitos na oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa. As concentrações plasmáticas e teciduais da carnitina diminuem a menos de 1 μmol/L na deficiência do transporte da carnitina, devido a defeitos na captação tecidual e à perda excessiva na urina. Por sua vez, na deficiência da CPT-I, a carnitina plasmática livre pode exceder 100 μmol/L (2 mg/dL). Tanto na deficiência da translocase como da CPT-II, a carnitina plasmática total pode ser normal, mas ocorre principalmente como ésteres acilcarnitina ésteres de ácidos graxos de cadeia longa – no primeiro caso, porque elas não podem ser transportadas para a mitocôndria e, no segundo, devido ao refluxo para fora da mitocôndria. Estas doenças são tratadas pela suplementação com carnitina e evitação evitando-se o jejum.

Mobilização dos lipídios durante a gliconeogênese e o trabalho

A insulina, o glucagon, a epinefrina e o cortisol controlam a direção do metabolismo do glicogênio e da glicose no fígado. Durante o jejum e a inanição, a gliconeogênese hepática é ativada pelo glucagon e requer a degradação coordenada de proteínas e a liberação de aminoácidos dos músculos, a degradação dos triacilgliceróis e a liberação de ácidos graxos do tecido adiposo. Este processo, conhecido como lipólise, é controlado pela enzima lipase hormônio-sensível no adipócito, que é ativada por fosforilação pela proteína quinase A dependente do AMPc em resposta ao aumento do glucagon plasmático (Cap. 21). Assim como a gliconeogênese, a lipólise é inibida pela insulina.

A ativação da lipase hormônio-sensível tem efeitos previsíveis – aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres, de glicerol e dos corpos cetônicos durante o jejum e a inanição (Fig. 15.9); efeitos similares são observados em resposta à epinefrina durante o estresse. A epinefrina ativa tanto a glicogenólise no fígado como a lipólise no tecido adiposo, desta forma, ambos os combustíveis – glicose e ácidos graxos – estarão elevados durante o estresse. O cortisol exerce um efeito crônico sobre a lipólise e também causa resistência à insulina. A síndrome de Cushing (Cap. 39), na qual há alta concentração de cortisol no sangue, é caracterizada por hiperglicemia, perda muscular e redistribuição das gorduras dos depósitos adiposos sensíveis ao glucagon para áreas atípicas como bochechas, parte superior das costas e tronco.

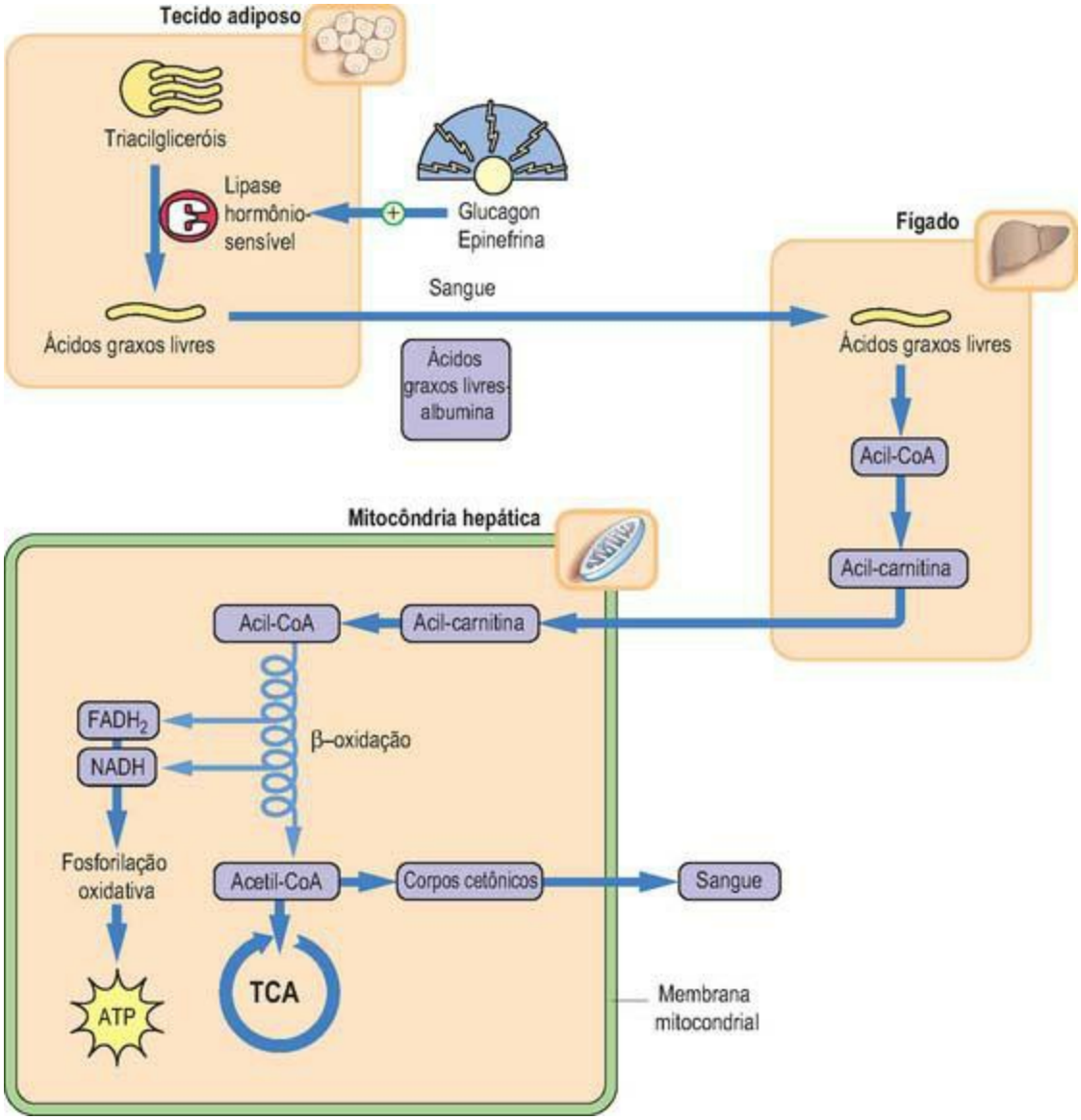


Fig. 15.9 Regulação do metabo-lismo dos lipídios pelo glucagon e epinefrina. O glucagon e a epinefrina ativam a lipase hormônio-sensível no tecido adiposo, em coordenação com a ativação da proteólise nos músculos e a gliconeogênese no fígado. O metabolismo dos ácidos graxos pela β-oxidação no fígado gera ATP para a gliconeogênese. O acetil-CoA é convertido em corpos cetônicos e liberado para o sangue. Estes efeitos são revertidos pela insulina após uma refeição.

SÍNDROME HELLP E APFL EM MÃES DE CRIANÇAS NASCIDAS COM LCHAD (INCIDÊNCIA DE 1 EM 200.000)

A deficiência da L-3-hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCHAD) pode se apresentar de várias formas. Os acometidos têm tendência a episódios de hipoglicemia não cetótica, mas podem desenvolver insuficiência hepática fulminante, miocardiopatia, rabdomiólise e, ocasionalmente, neuropatia e retinopatia. Como nas deficiências de MCAD ou de LCAD, o tratamento envolve evitar o jejum e uma dieta enriquecida de ácidos graxos de cadeia média.

Talvez a característica mais marcante deste defeito raro no metabolismo dos ácidos graxos seja sua associação com a HELLP (do inglês **h**aemolysis, **e**levated **l**iver enzimes and **l**o w **p**latelets – hemólise, enzimas hepáticas elevadas e plaquetas baixas) e a AFLP (do inglês, **a**cute **f**atty **l**iver of **p**regnancy – fígado gorduroso agudo da gravidez) maternas. Estas emergências obstétricas potencialmente fatais podem ocorrer nas mães que são heterozigotas para LCHAD, especialmente se

a criança tem LCHAD. Estas síndromes também estão associadas a outro defeito recessivo do metabolismo dos ácidos graxos, a deficiência da carnitina palmitoiltransferase-I.

Resumo

Ao contrário dos combustíveis carboidratos, que entram no corpo principalmente como glicose ou como açúcares que são rapidamente convertidos em glicose, os combustíveis lipídicos são heterogêneos em relação ao comprimento da cadeia, ramificações e insaturações. O catabolismo das gorduras é principalmente um processo mitocondrial, mas também ocorre nos peroxissomos. Utilizando uma variedade de processos de transporte específicos para o comprimento da cadeia e enzimas catabólicas, a via principal do catabolismo dos ácidos graxos envolve sua degradação oxidativa em unidades de dois carbonos – no processo conhecido como β-oxidação, que produz acetil-CoA. Em muitos tecidos, as unidades de acetil-CoA são utilizadas para a produção de ATP na mitocôndria. No fígado, o acetil-CoA é catabolizado em corpos cetônicos, principalmete o acetoacetato e o β-hidroxibutirato, por uma via mitocondrial chamada termogênese. Os corpos cetônicos são exportados do fígado para o metabolismo energético nos tecidos periféricos.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Compare o metabolismo do acetil-CoA no fígado e no músculo. Explique por que o fígado produz corpos cetônicos durante a gliconeogênese. O que evita a oxidação hepática do acetil-CoA?

2. Reveja os méritos do uso da carnitina como um ativador do desempenho durante o exercício e como um suplemento para pacientes geriátricos.

3. Reveja o uso atual e o mecanismo da ação de drogas proliferadoras de peroxissomos para o tratamento da dislipidemia e do diabetes.

Leituras sugeridas

Cahill GFJr. Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr*. 2006;26:1-22.

Charfen MA. Fernández-Frackelton M. Diabetic ketoacidosis. *Emerg Med Clin North Am*. 2005;23:609-628.

Freeland BS. Diabetic ketoacidosis. *Diabetes Educator*. 2003;29:384-395.

Klepper J, Leiendecker B. GLUT1 deficiency syndrome – 2007 update. *Dev Med Child Neurol*. 2007;49:707-716.

Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2006;142:77-85.

Solis JO, Singh RH. Management of fatty acid oxidation disorders: a survey of current treatment strategies. *J Am Diet Assoc*. 2002;102:1800-1803.

Wanders RJ, Waterham HR. Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763:1707-1720.

Wanders RJ, Jansen GA, Lloyd MD. Phytanic acid alpha-oxidation, new insights into an old problem: a review. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1631:119-135.

Wierzbicki AS, Lloyd MD, Schofield CJ, Feher MD, Gibberd FB. Refsum's disease: a peroxisomal disorder affecting phytanic acid alpha-oxidation. *J Neurochem*. 2002;80:727-735.

Wood PA. Defects in mitochondrial beta-oxidation of fatty acids. *Curr Opin Lipidol*. 1999;10:107-112.

Sites

Deficiência de acetil-CoA desidrogenase Deficiência de acetil-CoA desidrogenase. www.cdc.gov/genomics/hugenet/reviews/MCAD.htm.

Carnitina Carnitina. http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/othernuts/carnitine/.

Lipídios on-line Lipídios on-line – biblioteca de *slides*. www.lipidsonline.org/slides/.

Peroxissomos Peroxissomos. www.kcl.ac.uk/kis/schools/life_sciences/biomed/bscb/softcell/peroxi.html.

Alterações de peroxissomos Alterações de peroxissomos. www.emedicine.com/neuro/topic309.htm.

α-oxidação α-oxidação. www.uwsp.edu/chemistry/tzamis/boxanim.gif.

Biossíntese e Armazenamento de Ácidos Graxos

U.V. Kulkarni, I. Broom

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a via de síntese de ácido graxo, em particular os papéis da acetil-CoA carboxilase e da enzima multifuncional ácido graxo sintase.
- Descrever a regulação de curto e longo prazos da síntese de ácido graxo.
- Explicar os conceitos de alongamento e dessaturação da cadeia de ácido graxo.
- Descrever a síntese de triglicerídeos.
- Debater sobre a função endócrina do tecido adiposo.

INTRODUÇÃO

A maioria dos ácidos graxos de que os humanos necessitam provém da alimentação; no entanto, a via para sua síntese de novo (lipogênese) a partir de compostos de 2 carbonos está presente em muitos tecidos como fígado, cérebro, rim, glândulas mamárias e tecido adiposo. Em geral, a via de síntese de novo se encontra ativa principalmente em situações de excesso de consumo energético, especificamente na forma de excesso de carboidrato. Nessa situação, o carboidrato é convertido em ácido graxo no fígado e armazenado como triacilglicerol (TAG, também conhecido como triglicerídeo) no tecido adiposo. Em humanos, o tecido adiposo não é um local importante para a síntese de ácido graxo: o principal órgão lipogênico é o fígado. A lipogênese não parece ser um requerimento crítico em humanos, e nenhuma doença que acarrete risco de vida associada a sua disfunção foi identificada. No entanto, a lipogênese possui um importante papel no desenvolvimento da obesidade.

A via da lipogênese não é simplesmente o inverso da oxidação de ácidos graxos vista nas vias oxidativas (Cap. 15). A lipogênese requer um grupo de enzimas completamente diferente e ocorre em um compartimento celular diferente, o citosol. Além disso, ela utiliza a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ($NADP^+$) como fonte redutora, e não a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) necessária na β-oxidação.

SÍNTESE DE ÁCIDO GRAXO

Ácidos graxos são sintetizados a partir de acetil-CoA

A síntese de ácidos graxos nos sistemas de mamíferos pode ser considerada um processo com dois estágios, ambos dependentes de unidades de acetil-CoA e ambos empregando proteínas multifuncionais em complexos multienzimáticos.

- Estágio 1: formação do precursor-chave malonil-CoA a partir de acetil-CoA pela acetil-CoA carboxilase.

- Estágio 2: alongamento da cadeia de ácido graxo em incrementos de 2 carbonos pela ácido graxo sintase.

O estágio preparatório: acetil-CoA carboxilase

A carboxilação de acetil-CoA a malonil-CoA é a etapa-chave da síntese de ácido graxo

No primeiro estágio da biossíntese de ácido graxo, o acetil-CoA, derivado principalmente do metabolismo de carboidratos, é convertido em malonil-CoA pela ação da enzima acetil-CoA carboxilase (Fig. 16.1). Essa é uma enzima dependente de biotina com funções enzimáticas distintas e função de proteína carreadora: suas subunidades agem como uma biotina carboxilase, uma transcarboxilase e uma proteína carreadora de carboxil-biotina. Essa enzima é sintetizada na forma de um protômero inativo, cada protômero contendo todas as subunidades mencionadas anteriormente, uma molécula de biotina e um sítio alostérico regulatório para ligação do citrato (um metabólito do ciclo de Krebs) ou do palmitoil-CoA (o produto final da via de biossíntese de ácido graxo). Essa reação também se dá em estágios: inicialmente há a carboxilação da biotina, envolvendo adenosina trifosfato (ATP), seguida da transferência desse grupo carboxila para o acetil-CoA, produzindo o produto final da reação: malonil-CoA. Nesse estágio, o complexo enzima-biotina livre é liberado.

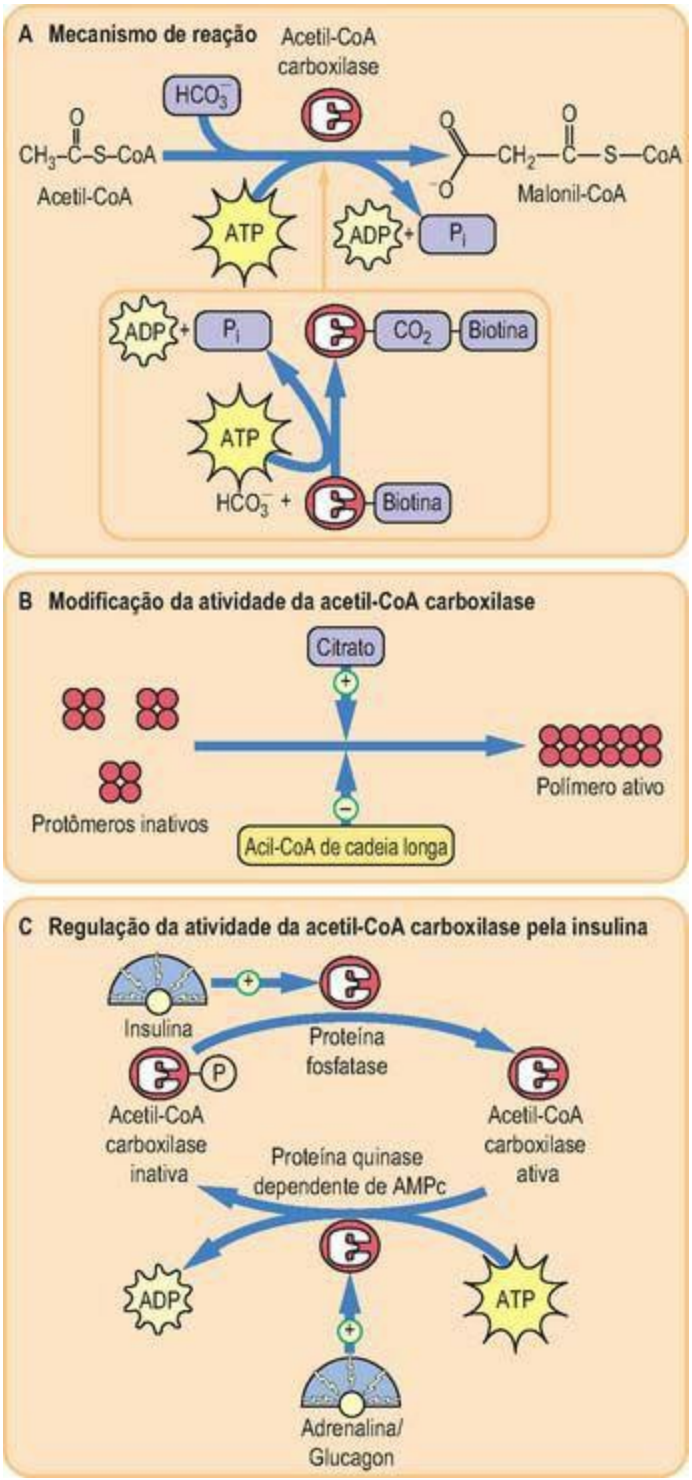


Fig. 16.1 Conversão do acetil-CoA em malonil-CoA. (A) Reação catalisada pela acetil-CoA carboxilase. A enzima se liga covalentemente à biotina, que é carboxilada utilizando uma molécula de ATP. (B) A acetil-CoA carboxilase requer a presença de citrato que estimula a polimerização para a sua forma ativa. (C) A atividade da acetil-CoA carboxilase é regulada por um mecanismo de fosforilação/desfosforilação. Esse, por sua vez, é controlado por hormônios que regulam o metabolismo do combustível: insulina, glucagon e adrenalina. AMPc, adenosina monofosfato cíclico.

Esse processo permite a síntese de ácidos graxos com número par de átomos de carbono no próximo estágio. O propionil-CoA é um substrato usado na síntese de ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono.

A acetil-CoA carboxilase está sujeita a uma rigorosa regulação

Os protômeros de acetil-CoA carboxilase se polimerizam na presença de citrato ou isocitrato, produzindo a forma ativa da enzima. O processo de polimerização também é inibido pelo palmitoil-CoA no mesmo sítio alostérico. Os respectivos efeitos estimulatório e inibitório do citrato e do

palmitoil-CoA são inteiramente lógicos: em condições de alta concentração de citrato, o armazenamento de energia é desejado, mas quando o palmitoil-CoA, o produto final da via, se acumula, uma diminuição na síntese de ácidos graxos é apropriada. Há um mecanismo adicional de controle, independente de citrato ou palmitoil-CoA, envolvendo a fosforilação e desfosforilação da enzima. Esse mecanismo envolve proteínas quinase/fosfatase dependente de hormônio (Fig. 16.1). A fosforilação inibe a enzima, e a desfosforilação ativa a enzima. A fosforilação da enzima é promovida por glucagon ou adrenalina, e a forma ativa desfosforilada é promovida pela insulina, que é um hormônio lipogênico.

A carboxilação do acetil-CoA a malonil-CoA direciona a via para a síntese de ácido graxo. É por esse motivo que essa enzima se encontra sob rigoroso controle a curto prazo. Existe também um controle de mais longo prazo exercido pela alimentação, através da indução ou repressão da síntese enzimática: a síntese de acetil-CoA carboxilase é aumentada em condições de ingesta de alto teor de carboidrato/baixo teor de gordura, enquanto a inanição ou uma ingesta de alto teor de gordura/baixo teor de carboidrato leva a uma diminuição na síntese dessa enzima.

Sintetizando uma cadeia de ácido graxo: ácido graxo sintase

O segundo passo importante na síntese de ácido graxo também envolve um complexo multienzimático, a ácido graxo sintase. Esse sistema enzimático é muito mais complexo que a acetil-CoA carboxilase. A proteína contém sete atividades enzimáticas distintas e uma proteína carreadora de acil (ACP). A ACP, uma proteína altamente conservada, substitui a CoA como a entidade que se liga à cadeia de ácido graxo para seu alongamento. A estrutura dessa molécula está ilustrada na Figura 16.2 e consiste em um dímero de grandes polipeptídeos idênticos dispostos em direções opostas. Cada monômero possui todas as sete atividades enzimáticas e a ACP. Ele também possui um longo grupo panteteína que funciona como um "braço" flexível, permitindo que a molécula que está sendo sintetizada esteja acessível a diferentes enzimas no complexo ácido graxo sintase. A função de síntese de ácido graxo é compartilhada pelas duas cadeias polipeptídicas.

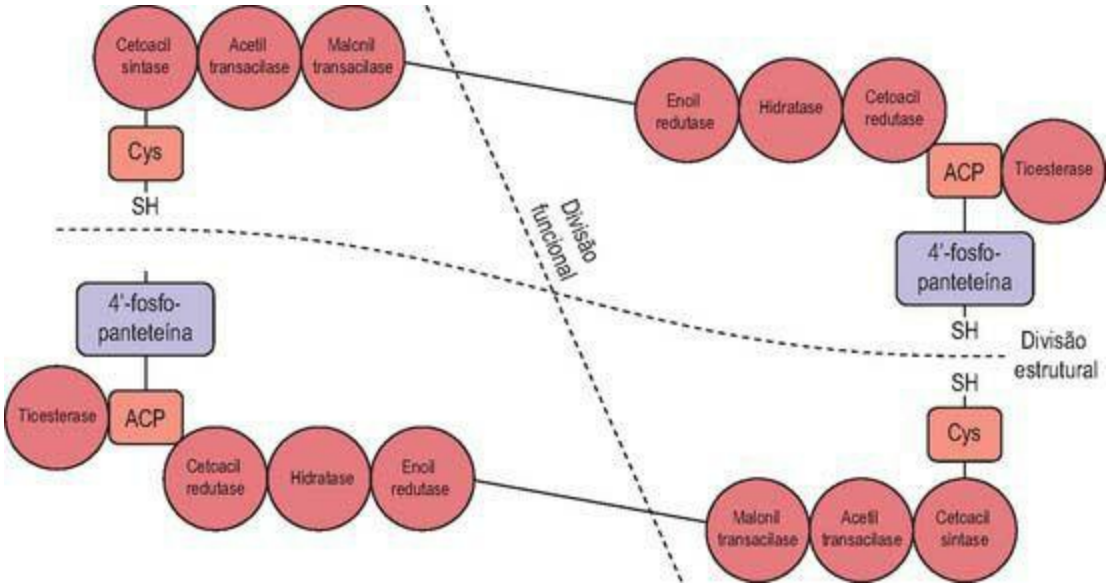


Fig. 16.2 Estrutura da ácido graxo sintase. A ácido graxo sintase é um dímero constituído de duas subunidades grandes dispostas em direções opostas. Ela contém sete atividades enzimáticas distintas e uma proteína carreadora de acil (ACP). Cys, cisteína.

A ácido graxo sintase sintetiza a molécula de ácido graxo com até 16 carbonos de comprimento

A reação prossegue após uma ligação inicial do grupo cisteína (Cys-SH) com o acetil-CoA, uma reação catalisada pela acetil transacilase (Fig. 16.3). O malonil-CoA é então transferido pela malonil transacilase para o resíduo -SH do grupo panteteína ligado à ACP da outra subunidade. Depois, a 3-cetoacil sintase (a enzima condensadora) catalisa a reação entre o grupo acetil previamente acoplado e o resíduo de malonil, liberando CO_2 e formando o complexo 3-cetoacil – enzima. Isso libera o resíduo de cisteína da cadeia 1 que se encontrava ocupado pelo acetil-CoA. O grupo 3-cetoacil posteriormente sofre sequencialmente redução, desidratação e nova redução, formando um complexo acil–enzima saturado. A próxima molécula de malonil-CoA desloca o grupo acil do grupo pantoteína-SH para o grupo cisteína recém-liberado, e a sequência de reação é repetida por mais seis ciclos (sete ciclos no total). Uma vez que a cadeia de 16 carbonos (palmitato) é formada, o complexo acil-enzima saturado ativa a tioesterase, liberando a molécula de palmitato do complexo enzimático.

Os dois sítios -SH estão agora livres, permitindo que um novo ciclo de síntese de palmitato seja iniciado.

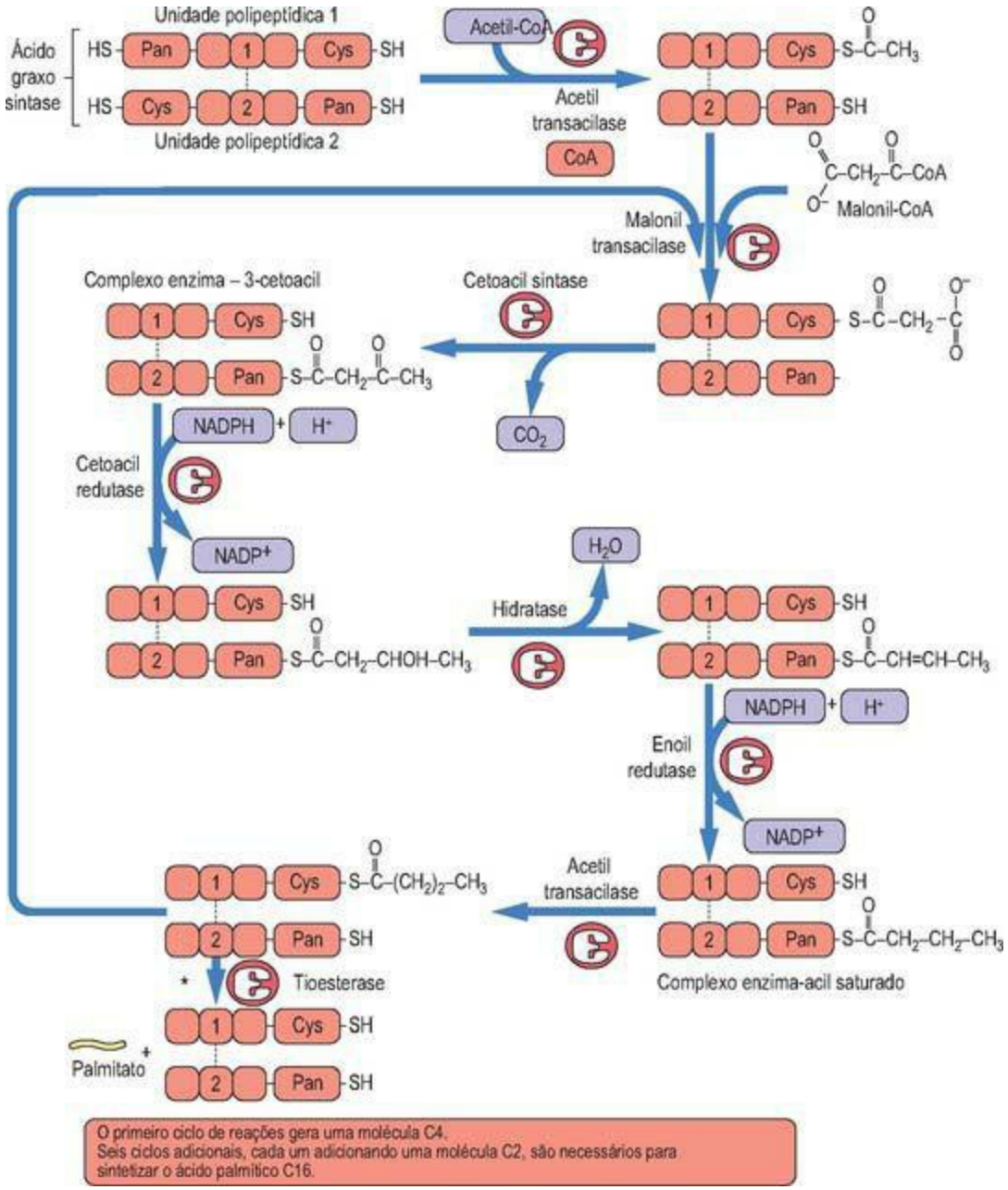


Fig. 16.3 Reações catalisadas pela ácido graxo sintase. A síntese da cadeia de ácido graxo é iniciada por uma molécula de malonil-CoA (C3) que reage com a primeira molécula de acetil-CoA (C2); isso produz uma molécula C4 (um carbono é perdido em forma de CO_2 durante a condensação de malonil-CoA e acetil-CoA). Existem mais seis ciclos, cada um adicionando 2C à cadeia de ácido graxo (sete ciclos no total), e o resultado é uma molécula de palmitato com 16 carbonos. NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida; Pan, panteteína.
*Essa reação ocorre uma vez que a cadeia de acil graxo de 16 carbonos esteja formada.

A síntese de uma molécula de palmitato requer 8 moléculas de acetil-CoA, 7 de ATP, 14 de NADPH e 14 H+:

$$8\ \text{AcCoA} + 7\ \text{ATP} + 14\ \text{NADPH} + 14\ \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}^-$$
$$(\text{palmitato}) + 14\ \text{NADP}^+ + 8\ \text{CoA} + 6\ \text{H}_2\text{O} + 7\ \text{ADP} + 7\ \text{Pi}$$

Assim como o sistema da acetil-CoA carboxilase, a ácido graxo sintase também é regulada pelo

fluxo de substrato (a presença de açúcares fosforilados) através de um efeito alostérico e também por indução e repressão da enzima.

A alteração na quantidade de enzima é exercida pelo estado nutricional do indivíduo; consequentemente, esse é o principal fator que controla a taxa de lipogênese. As taxas de síntese de ácido graxo são maiores quando um indivíduo segue uma dieta de alto teor de carboidrato/baixo teor de gordura e são baixas durante jejum/inanição ou numa dieta de alto teor de gordura. Situações em que há uma alta concentração sistêmica de ácidos graxos levam a uma marcante inibição da lipogênese.

A lançadeira de malato

A lançadeira de malato permite o recrutamento de unidades de 2 carbonos da mitocôndria para o citoplasma

A molécula primária necessária para a síntese de ácidos graxos é a acetil-CoA. No entanto, a acetil-CoA é gerada na mitocôndria e não consegue atravessar livremente a membrana mitocondrial interna. Como mencionado anteriormente, a biossíntese de ácido graxo ocorre no citosol. A lançadeira de malato é um mecanismo que permite a transferência de unidades de 2 carbonos da mitocôndria para o citosol: ele envolve o antiporte malato-citrato (Fig. 16.4). O piruvato derivado da glicólise é descarboxilado em acetil-CoA na mitocôndria: subsequentemente ele reage com oxalacetato no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Cap. 14) para formar o citrato. A translocação de uma molécula de citrato para o citosol por antiporte é acompanhada pela transferência de uma molécula de malato para a mitocôndria. No citosol, o citrato, na presença de ATP e CoA, é submetido a uma clivagem em acetil-CoA e oxalacetato pela citrato liase. Isso disponibiliza o acetil-CoA para carboxilação em malonil-CoA e para a síntese de ácidos graxos. A síntese de ácidos graxos é também ligada ao metabolismo da glicose através da via da pentose fosfato que é a maior fornecedora de NADPH necessário à lipogênese. Uma parte do NADPH é também gerada pela descarboxilação do malato a piruvato, dependente de $NADP^+$, pela enzima málica:

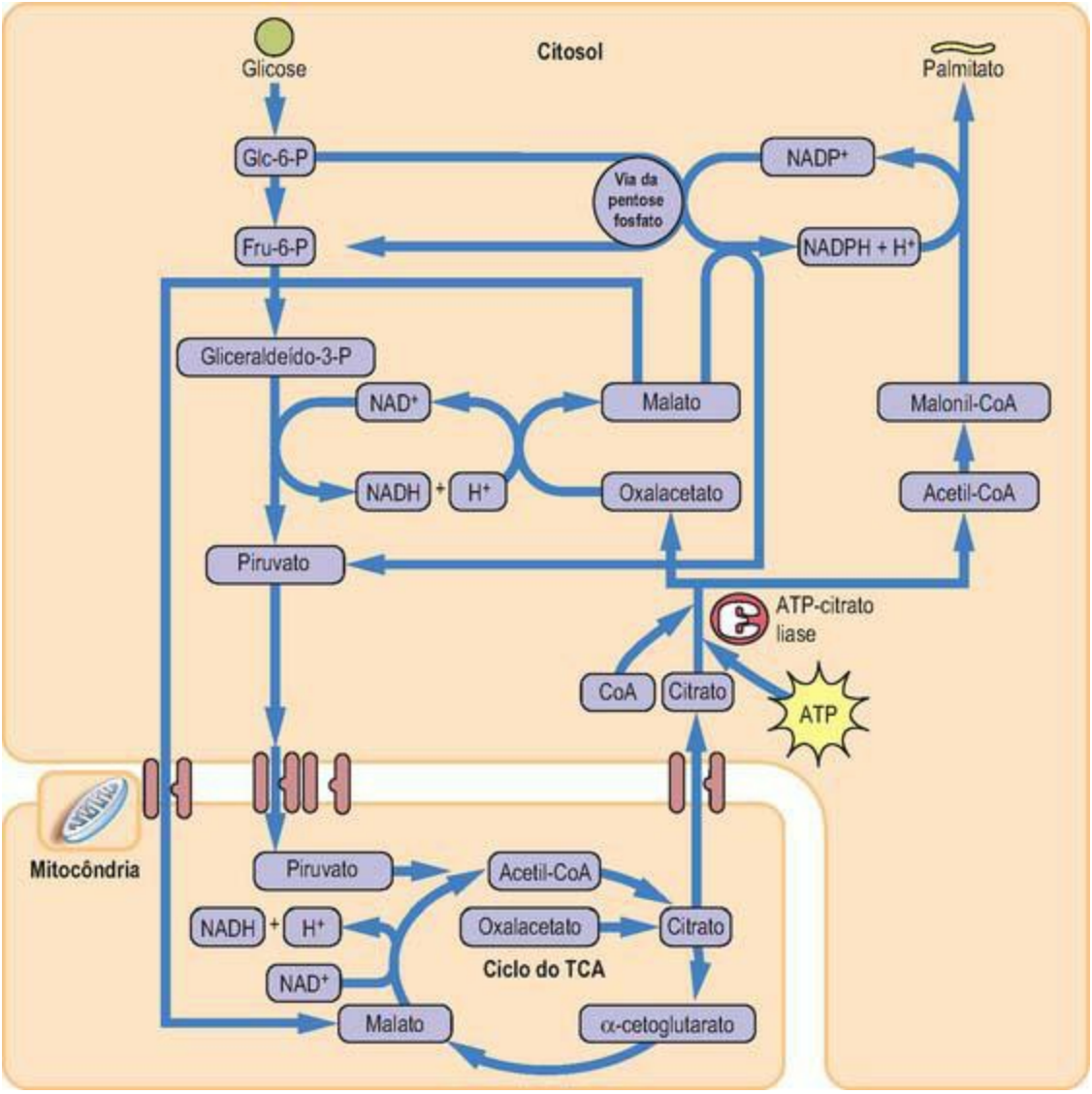


Fig. 16.4 A lançadeira de malato. A acetil-CoA é gerada na mitocôndria e não consegue atravessar a membrana mitocondrial. A lançadeira de malato facilita o transporte das unidades de 2 carbonos das mitocôndrias para o citoplasma. A acetil-CoA é ressintetizada no citoplasma e entra na lipogênese. Fru-6-P, Frutose-6-fosfato; Glc-6-P, Glicose-6-fosfato; NADH, nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzido). (Fig. 9.7.)

$$\text{Malato} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{piruvato} + \text{CO}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

ALONGAMENTO DO ÁCIDO GRAXO

O alongamento da cadeia de ácido graxo além de 16 carbonos requer um outro conjunto de enzimas.

O palmitato liberado da ácido graxo sintase se torna um substrato para a síntese de cadeias de ácidos graxos mais longas, com exceção de alguns ácidos graxos essenciais (veja adiante). O alongamento da cadeia ocorre através da adição de novos fragmentos de 2 carbonos derivados do malonil-CoA (Fig. 16.5). Esse processo ocorre no retículo endoplasmático por ação de um outro complexo multienzimático – a ácido graxo alongase. As reações que ocorrem durante o alongamento da cadeia são similares àquelas envolvidas na síntese de ácido graxo, com a exceção do ácido graxo, que é acoplado à CoA, em vez da ACP.

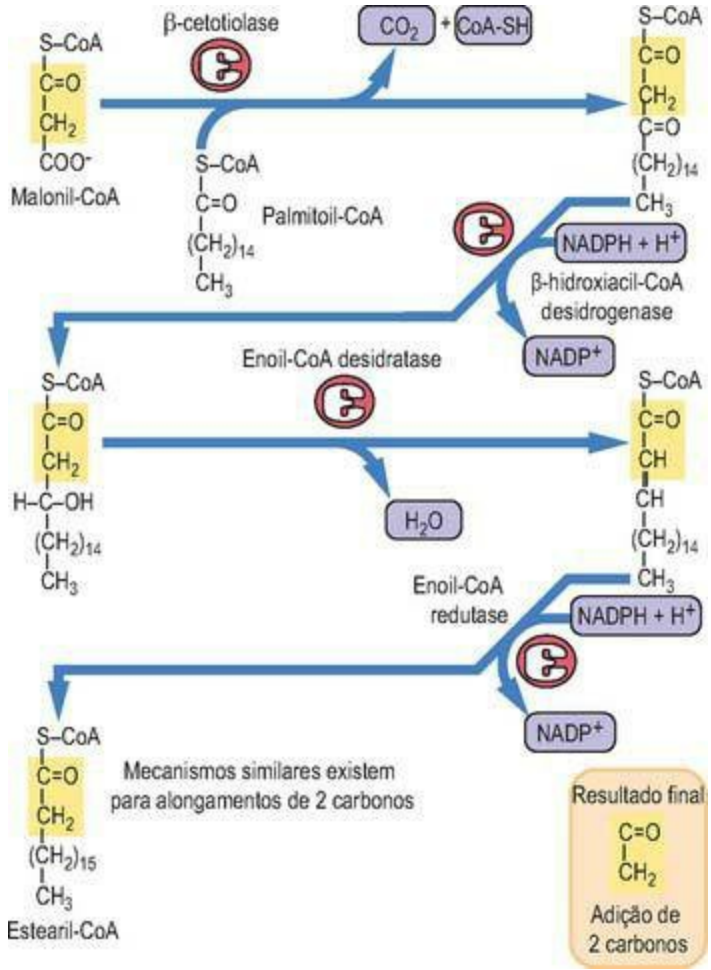


Fig. 16.5 Alongamento de ácidos graxos. O alongamento de ácidos graxos ocorre no retículo endoplasmático e é efetuado por um complexo multienzimático, a ácido graxo alongase.

Os substratos para a ácido graxo alongase citosólica são ácidos graxos saturados com cadeia contendo de 10 carbonos para cima, e também ácidos graxos insaturados. Ácidos graxos de cadeia muito longa (22-24 carbonos) são produzidos no cérebro, e o alongamento do estearil-CoA (C18) no cérebro aumenta rapidamente durante a mielinização, produzindo ácidos graxos requeridos para a síntese de esfingolipídeos.

ANORMALIDADES LIPÍDICAS NO ALCOOLISMO

Uma mulher de 36 anos de idade atendida em um centro de saúde da mulher, apresentou concentrações séricas de triglicerídeo de 73,0 mmol/L (6.388 mg/dL) e de colesterol de 13 mmol/L (503 mg/dL). Após uma evasiva inicial, ela admitiu beber três garrafas de vodca e seis garrafas de vinho por semana. Quando ela se absteve do álcool, a concentração de triglicerídeo foi reduzida a 2 mmol/L (175 mg/dL) e a concentração de colesterol a 5 mmol/L (193 mg/dL). Três anos depois, a mulher se apresentou novamente com fígado dilatado e o retorno das anormalidades lipídicas. Uma biópsia do fígado indicou doença hepática alcoólica com esteatose, ou seja, células hepáticas infiltradas com gordura.

Comentário. Em indivíduos alcoólatras, o metabolismo do álcool produz quantidades aumentadas de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida ($NADH^+$) no fígado. Um aumento na razão $NADH + H^+/NAD^+$ inibe a oxidação de ácidos graxos. Ácidos graxos que chegam ao fígado sejam de fontes alimentares ou mobilizados do tecido adiposo são reesterificados com glicerol para formar triglicerídeos. Nos estágios iniciais de alcoolismo, estes são reunidos com apolipoproteínas e secretados como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Concentrações crescentes de VLDL e, portanto, de triglicerídeos séricos, estão frequentemente presentes em estágios iniciais de doença hepática alcoólica. Com o progresso da doença hepática, surge uma falha na produção de apolipoproteínas e na secreção de gordura na forma de VLDL, resultando em um acúmulo de triglicerídeos nas células hepáticas.

Os ácidos graxos também podem ser alongados na mitocôndria, onde outro sistema é utilizado: é NADH dependente e usa acetil-CoA como fonte de fragmentos de dois carbonos. É simplesmente o reverso da β-oxidação (Cap. 15) e os substratos para o alongamento de cadeia são ácidos graxos de cadeia média e curta contendo menos do que 16 átomos de carbono. Durante o jejum e a estarvação, o alongamento de ácidos graxos é intensamente reduzido.

DESSATURAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Reações de dessaturação requerem oxigênio molecular

O corpo tem uma necessidade de ácidos graxos mono- e poli-insaturados, além dos ácidos graxos saturados. Alguns destes precisam ser fornecidos através da alimentação; esses dois ácidos graxos insaturados, linoleico e linolênico, são conhecidos como ácidos graxos essenciais (EFA; ver adiante). O sistema de dessaturação requer oxigênio molecular, NADH e citocromo b_5. O processo de dessaturação, assim como o de alongamento da cadeia, ocorre no retículo endoplasmático e resulta na oxidação de ambos, ácido graxo e NADH (Fig. 16.6).

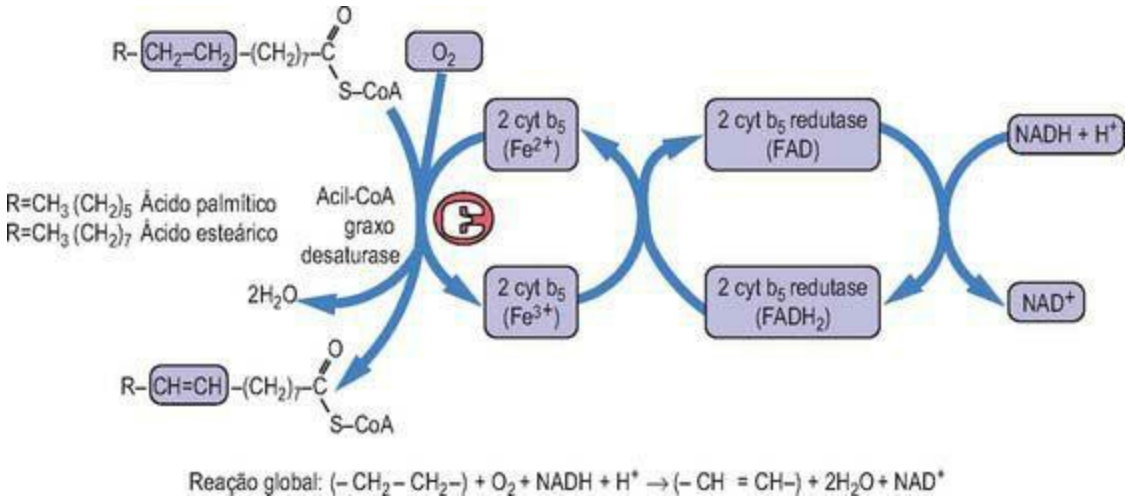


Fig. 16.6 Dessaturação de ácidos graxos. A dessaturação de ácidos graxos ocorre no retículo endoplasmático. A reação requer oxigênio molecular, $NADH_2$, $FADH_2$ e citocromo b_5. cyt b_5, citocromo b_5; FAD, flavina adenina dinucleotídeo; $FADH_2$, flavina adenina dinucleotídeo reduzido; Fe^{3+}, Íon férrico.

MUDANÇAS NA EXPRESSÃO ENZIMÁTICA EM RESPOSTA A INGESTÃO DE ALIMENTO REGULA O ARMAZENAMENTO DE SUBSTRATOS ENERGÉTICOS

O estado alimentado está associado com a indução de enzimas que aumentam a síntese de ácidos graxos no fígado. Um grande grupo de enzimas são induzidas, incluindo aquelas envolvidas na glicólise, exemplo glicoquinase (forma hepática da hexoquinase) e piruvato quinase, assim como enzimas ligadas à produção aumentada de NADPH (Glc-6-P desidrogenase, 6-P-gluconato desidrogenase, e enzima málica). Além disso, existe expressão aumentada de citrato liase, acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase, e Δ^9 desaturase.

Além disso, no estado alimentado, existe concomitante uma repressão de enzimas chave envolvidas na gliconeogênese. Fosfoenolpiruvato carboxiquinase, glicose-6-P fosfatase (Glc-6-P-ase), e algumas aminotransferases encontram-se reduzidas em quantidade, ou por redução na síntese ou por aumento na degradação (Cap. 21).

No homem, o sistema da desaturase é incapaz de introduzir duplas ligações entre átomos de

carbono além do átomo de carbono-9 e carbono ω (metil terminal). A maioria das dessaturações ocorre entre os átomos de carbono 9 e 10 (chamados de dessaturações Δ^9), como, por exemplo, aquela com o ácido palmítico produzindo ácido palmitoleico (C-16:1, Δ^9) e aquela com o ácido esteárico produzindo ácido oleico (C-18:1, Δ^9).

ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS

Os ácidos graxos ω-3 e ω-6 (ou seus precursores) devem ser fornecidos através da alimentação

Como discutido anteriormente, a desaturase humana é incapaz de introduzir duplas ligações além de C-9. Por outro lado, dois tipos de ácidos graxos – aqueles contendo duplas ligações no terceiro carbono a partir do metil terminal (ácidos graxos ω-3) e no sexto carbono a partir do metil terminal (ácidos graxos ω-6) – são necessários para a síntese de eicosanoides (ácidos graxos C-20), precursores de moléculas importantes como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Portanto, os ácidos graxos ω-3 e ω-6 (ou seus precursores) devem ser fornecidos através da alimentação. De fato, eles são obtidos pelo consumo de óleos vegetais que contêm o ácido graxo ω-6, ácido linoleico (C-18:2, $\Delta^{9,12}$) e o ácido graxo ω-3, ácido linolênico (C-18:3, $\Delta^{9,12,15}$). O ácido linoleico é convertido por uma série de reações de alongamento e dessaturação em ácido araquidônico (C-20:4, $\Delta^{5,8,11,14}$), o precursor da síntese de outros eicosanoides no homem. O alongamento e a dessaturação do ácido linolênico produzem o ácido eicosapentaenoico (EPA; C-20:5, $\Delta^{5,8,11,14,17}$), que é um precursor de outra série de eicosanoides (Tabela 3.2).

ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRAXOS: A SÍNTESE DE TRIACILGLICERÓIS

Ácidos graxos, derivados da síntese endógena ou da alimentação, são armazenados e transportados como triacilgliceróis

No fígado e no tecido adiposo, os triacilgliceróis são produzidos por uma via envolvendo o ácido fosfatídico como intermediário (Fig. 16.7). A fonte de glicerol-fosfato é, no entanto, diferente nos dois tecidos. O próprio glicerol é a fonte de ácido fosfatídico no fígado. Porém, no tecido adiposo, devido à falta de glicerol quinase, a glicose é a fonte indireta de glicerol, com o metabólito glicolítico di-hidroxiacetona fosfato sendo o seu precursor imediato (Fig. 16.7). O armazenamento de ácidos graxos no tecido adiposo ocorre, portanto, somente quando a glicólise está ativada, ou seja, no estado alimentado.

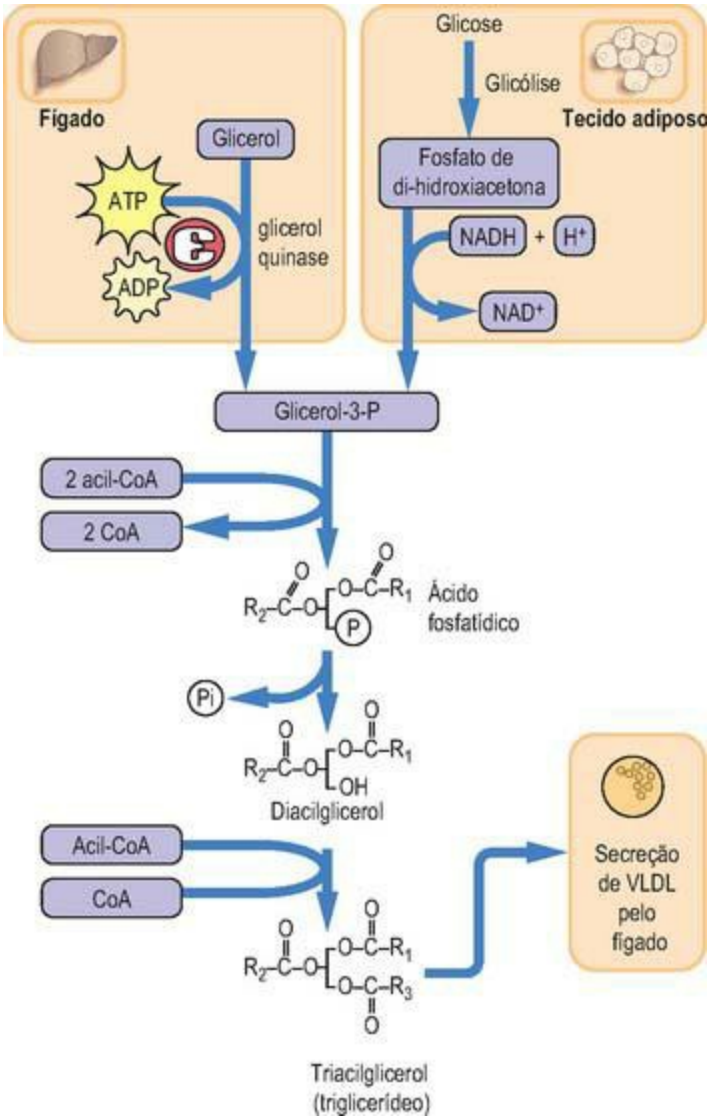


Fig. 16.7 Síntese do triacilglicerol. Os triacilgliceróis (triglicerídeos) são sintetizados no fígado e no tecido adiposo. A fonte de glicerol-3-P é diferente nos dois tecidos. No fígado é o glicerol, mas o tecido adiposo não possui atividade de glicerol quinase. Neste, o glicerol-3-P é formado a partir do intermediário da glicólise, di-hidroxiacetona fosfato.

Os triacilgliceróis produzidos no retículo endoplasmático liso do fígado não são armazenados ali, mas são conjugados com colesterol, fosfolipídeos e apolipoproteínas (também sintetizadas no retículo endoplasmático) para serem secretados na forma de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). As VLDL são então processadas no complexo de Golgi e liberadas na corrente sanguínea para captação por outros tecidos.

Uma vez liberadas no sangue, as VLDL sofrem ação da lipoproteína lipase (LPL). Essa enzima é encontrada acoplada a glicoproteínas da membrana basal do endotélio capilar e é ativa tanto sobre VLDL quanto quilomícrons, sendo o último originado no intestino após a ingestão de alimentos (Cap. 18). A natureza dessa enzima é diferente de tecido para tecido: a isoenzima muscular possui um K_m muito baixo para o substrato e, portanto, permite a utilização de ácidos graxos da VLDL, para transdução de energia, mesmo em concentrações muito baixas. No adipócito, no entanto, a isoenzima possui um valor de K_m alto para o substrato e logo só é ativa em termos de captação de ácidos graxos pelo tecido adiposo, quando as concentrações de VLDL e quilomícrons estão elevadas.

No estado alimentado, quando o tecido adiposo está ativamente captando ácidos graxos a partir de lipoproteínas e os armazenando como triacilgliceróis, os adipócitos sintetizam LPL e a secretam nos capilares do tecido adiposo. Esse aumento na síntese e secreção de LPL é estimulado pela alta razão de insulina:glucagon observada na alimentação. Níveis elevados de insulina também estimulam a captação de glicose pelo tecido adiposo e promovem a glicólise. Isso tem como efeito líquido a produção de quantidades aumentadas de glicerol, bem como facilita a síntese de triacilgliceróis no adipócito.

A insulina é um hormônio importante para a síntese e armazenamento de ácido graxo (Fig. 16.8). Ela promove a captação de glicose tanto no fígado quanto no tecido adiposo. No fígado, por aumentar os níveis de frutose-2,6-bifosfato, ela estimula a glicólise, aumentando assim a produção de piruvato. Ao estimular a desfosforilação do complexo piruvato desidrogenase e ativar essa enzima, a insulina promove a produção de acetil-CoA, estimulando assim o ciclo da TCA e aumentando os níveis de citrato que, por sua vez, através da estimulação da acetil-CoA carboxilase, aumentam a taxa de síntese de ácido graxo (Cap. 21).

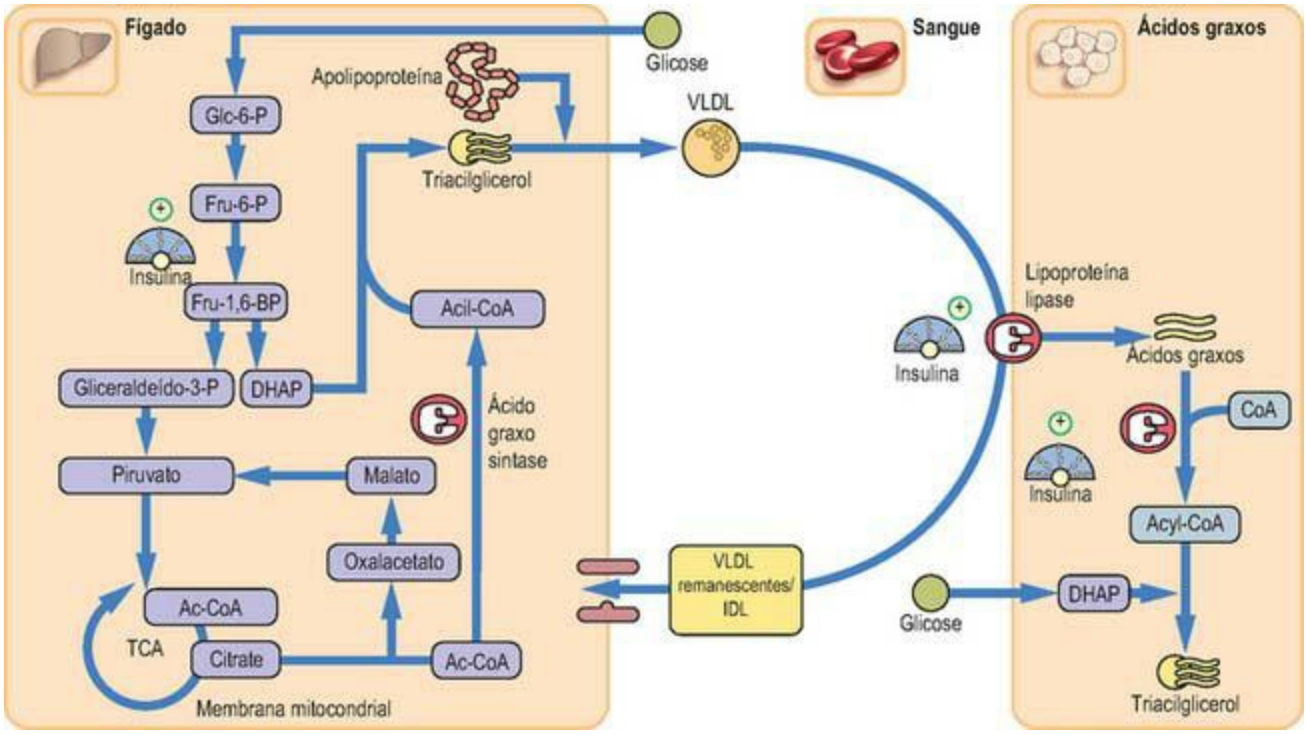


Fig. 16.8 Transporte e armazenamento da gordura em resposta à alimentação. Uma refeição estimula a secreção de insulina, e a insulina direciona o metabolismo de gorduras para a síntese e armazenamento. A insulina estimula a glicólise no fígado, aumentando desse modo a produção de piruvato. Além disso, ela ativa o complexo piruvato desidrogenase (por desfosforilar a enzima) e, portanto, promove a síntese de acetil-CoA a partir do piruvato. Isso estimula o ciclo do TCA e gera citrato. O citrato por sua vez estimula a acetil-CoA carboxilase, aumentando a taxa de biossíntese de ácido graxo. DHAP, di-hidroxiacetona fosfato; Fru-1,6-BP, frutose-1,6-bifosfato; Glc-6-P, glicose-6-fosfato; IDL, lipoproteína de densidade intermediária; TCA, ciclo do ácido tricarboxílico; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade. (Veja detalhes no capítulo 18 sobre o metabolismo de lipoproteínas; compare também com a Figura 21.11.)

REGULAÇÃO DOS ESTOQUES DE GORDURA CORPORAL TOTAL

O tecido adiposo é um órgão endócrino ativo

Já se sabe há muito tempo que um aumento no consumo de energia sem um aumento adequado no gasto de energia está associado com a obesidade, a qual é caracterizada por uma maior adiposidade, tanto em termos de número de adipócitos quanto de seu conteúdo de gordura. Está claro que o tecido adiposo, longe de ser um reservatório inerte, é hormonalmente ativo. Hormônios como leptina, adiponectina e resistina (conhecidas conjuntamente como adipocinas), fatores de crescimento como fator de crescimento do endotélio vascular e citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF-α) e interleucina 6 (IL-6) são todos produzidos por adipócitos (Cap. 22).

A quantidade de leptina presente no sangue é proporcional à quantidade de gordura corporal

A principal molécula que demonstrou, até agora, conter informações sobre os estoques de gordura em um indivíduo é a leptina. Os níveis de leptina sinalizam a quantidade de tecido adiposo presente. Ela atravessa a barreira hematoencefálica, reduz o apetite e leva a um aumento no gasto energético. Animais deficientes em leptina são obesos e letárgicos; a reposição de leptina nesses animais reverte essas características. No entanto, a maioria de indivíduos obesos possui altos níveis de leptina sem que isso limite seu peso. Eles parecem ser resistentes ao efeito da leptina no sistema nervoso central, e a administração de leptina adicional não resulta na resolução das características clínicas e metabólicas da obesidade.



ESTILO DE VIDA E OBESIDADE

Um ex-soldado de infantaria do exército, de 48 anos de idade (altura 1,91 m), apresentou problemas de ganho de peso nos últimos oito anos após sair do exército. No momento do seu afastamento da ativa, ele pesava 95 kg, mas no momento da consulta pesava 193 kg. Sua ocupação atual era motorista de caminhão. Ele negou qualquer mudança na dieta desde que saiu do exército, mas admitiu que pratica pouco ou nenhum exercício. Um questionamento detalhado indicou que sua dieta diária fornecia de 12.600 a 16.800 kJ (3.000 e 4.000 kcal), com ingesta de gordura próxima dos 40%. O paciente foi inicialmente colocado em uma dieta saudável, com ingesta de gordura reduzida para 35% do total de calorias. Aconselharam-no a se exercitar e ele passou a nadar de três a quatro vezes por semana. Seu peso começou imediatamente a cair, rapidamente no início e depois de 3-4 kg por mês, até se estabilizar em 145-150 kg. Ele foi colocado, então, em uma dieta rica em proteína, e pobre em carboidrato e gordura, levando ao retorno da perda de peso que durou por mais um ano, resultando em um peso final de 93 kg.

Comentário. A obesidade vem crescendo em prevalência em muitas partes do mundo. A obesidade clínica está claramente definida em termos de altura e peso através do índice de massa corporal (IMC), que é calculado dividindo-se o peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros (veja detalhes no capítulo 13):

$$\text{IMC (kg/m}^2) = \rightarrow \frac{\text{peso (kg)}}{(\text{altura [m]})^2}$$

Um IMC de 25-30 kg/m^2 é classificado como sobrepeso ou obesidade grau I, IMC >30 kg/m^2 é dito obesidade clínica ou de grau II, e IMC >40 kg/m^2 é classificado como obesidade mórbida ou de grau III. Nosso paciente tinha um IMC de 53 no momento da consulta caindo para 26 após dieta prolongada. Se o consumo de energia exceder o gasto de energia por tempo prolongado então haverá ganho de peso. A obesidade predispõe a várias doenças. A mais importante é *diabetes mellitus* tipo 2: oitenta por cento dos casos desse tipo de diabetes estão associados com a obesidade. Entre outras doenças associadas estão doença cardíaca coronariana, hipertensão, acidente vascular cerebral, artrite e doença de cálculos vesiculares (Cap. 22).

Alguns agentes semelhantes a hormônios estão envolvidos nos estoques totais de gordura corporal

Os níveis de insulina também são afetados pela quantidade de gordura corporal, com o pâncreas endócrino secretando maiores quantidades para compensar o fenômeno da resistência à insulina (Cap. 21), que é observado particularmente na obesidade abdominal. Há uma relação complexa entre insulina, peso e estoques de gordura: já se demonstrou que a insulina possui um efeito supressor do apetite no sistema nervoso central, mas frequentemente causa ganho de peso em pessoas com diabetes que iniciam tratamento com injeções de insulina. Fisiologicamente, a insulina inibe a lipólise, e suas ações são influenciadas por outros hormônios liberados pelo tecido adiposo, como a adiponectina.

O número de hormônios e marcadores celulares envolvidos na integração do balanço energético e dos estoques de tecido adiposo está aumentando e suas inter-relações são complexas (Caps. 21 e 22). Isso é agravado pelo fato de esses mecanismos fisiológicos se integrarem e poderem ser sobrepostos por fatores ambientais, sociais e comportamentais.

Resumo

- A síntese e armazenamento de ácidos graxos são componentes essenciais da homeostase da energia do corpo.

- A lipogênese ocorre no citosol. Sua etapa-chave é a reação catalisada pela acetil-CoA carboxilase.

- O alongamento da cadeia de ácido graxo (até um comprimento de 16 átomos de carbono) é realizado pela ácido graxo sintase dimérica, que possui várias atividades enzimáticas. Ambas estão sujeitas a uma regulação complexa.

- A lançadeira de malato facilita a transferência de unidades de 2 carbonos da mitocôndria para o citoplasma para serem usadas na lipogênese.

- O poder redutor na forma de NADPH é suprido pela via da pentose fosfato e também pela lançadeira de malato.

- Os ácidos graxos insaturados essenciais são o ácido linoleico e linolênico. O ácido linoleico é convertido em ácido araquidônico, que por sua vez serve como precursor de prostaglandinas.

- Sinais de adiposidade são fornecidos pelas adipocinas, particularmente a leptina. A insulina também é importante para a regulação da alimentação.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Descreva como uma cadeia crescente de ácidos graxos é transferida entre as subunidades da ácido graxo sintase.

2. Como os eicosanoides são sintetizados?

3. Explique por que a taxa de lipólise no estado de satisfação é baixa.

4. Qual o papel das adipocinas?

5. Descreva a etapa limitante da lipogênese e sua regulação.

6. Quais são as fontes de acetil-CoA para a síntese de ácido graxo?

7. Compare e contraste a lipogênese e a lipólise.

Leituras sugeridas

Angulo P. *Nonalcoholic fatty liver disease*. 2002;346:1221-1231.

Lenz A, Diamond FB. *Obesity: the hormonal milieu*. 2008;15:9-20.

Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. *Apetite control*. 2005;184:291-318.

Biossíntese de Colesterol e Esteroides

M.H. Dominiczak

A.M. Wallace

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Listar os principais passos envolvidos na síntese da molécula de colesterol.
- Discutir a regulação da concentração intracelular de colesterol.
- Explicar os mecanismos que governam o metabolismo e a excreção do colesterol.
- Descrever os ácidos biliares e sua circulação êntero-hepática.
- Resumir as principais vias de síntese dos hormônios esteroides.

INTRODUÇÃO

O colesterol é um componente essencial das membranas celulares dos mamíferos. Ele também é o precursor de compostos ativos biologicamente importantes, tais como os ácidos biliares, hormônios esteroides e vitamina D. A hemostasia do colesterol é importante na etiologia da aterosclerose (Cap. 18) e ele é o principal componente das pedras na vesícula.

Os humanos sintetizam 1 g de colesterol a cada dia, principalmente no fígado. A taxa de síntese de colesterol endógeno e a ingestão pela dieta determinam sua concentração no plasma. Uma dieta diária típica do ocidente contém aproximadamente 500 mg (1,2 mmol) de colesterol diariamente, principalmente na carne, ovos e produtos do leite (Cap. 22). Sob circunstâncias normais, 30-60% disto são absorvidos durante a passagem através dos intestinos. Após a absorção intestinal, o colesterol é transportado para o fígado e para os tecidos periféricos como um componente das partículas de lipoproteína, os quilomícrons. Eles são absorvidos pelo fígado. O fígado reempacota o colesterol e os triglicerídeos em outras lipoproteínas menores – as lipoproteínas de muito baixa densidade, VLDL (Cap. 18). Os triglicerídeos contidos nas VLDL passam por hidrólises sequenciais nos tecidos periféricos, transformando as partículas em VLDL remanescentes e então, após hidrólises mais extensas, em lipoproteínas de baixa densidade (LDL). As VLDL remanescentes e as LDL levam o colesterol de volta para o fígado pela ligação ao receptor de membrana apoBE (receptor de LDL). Entretanto, eles também podem entrar pela parede vascular.

Os humanos não podem metabolizar o anel esteroide do colesterol – ele é excretado na bile ou como colesterol livre ou na forma de ácidos biliares. A maior parte dos ácidos biliares é reabsorvida no Íleo terminal e volta ao fígado. Este ciclo é conhecido como circulação êntero-hepática.

Nos passos iniciais, a via da síntese do colesterol fornece substratos para a síntese de compostos importantes na proliferação celular e no crescimento tumoral, no transporte de elétrons e na melhora do estresse oxidativo. Os oxiesteroides gerados nos estágios tardios da via são moléculas de sinalização que tomam parte na regulação da homeostasia do colesterol (Fig. 17.1).

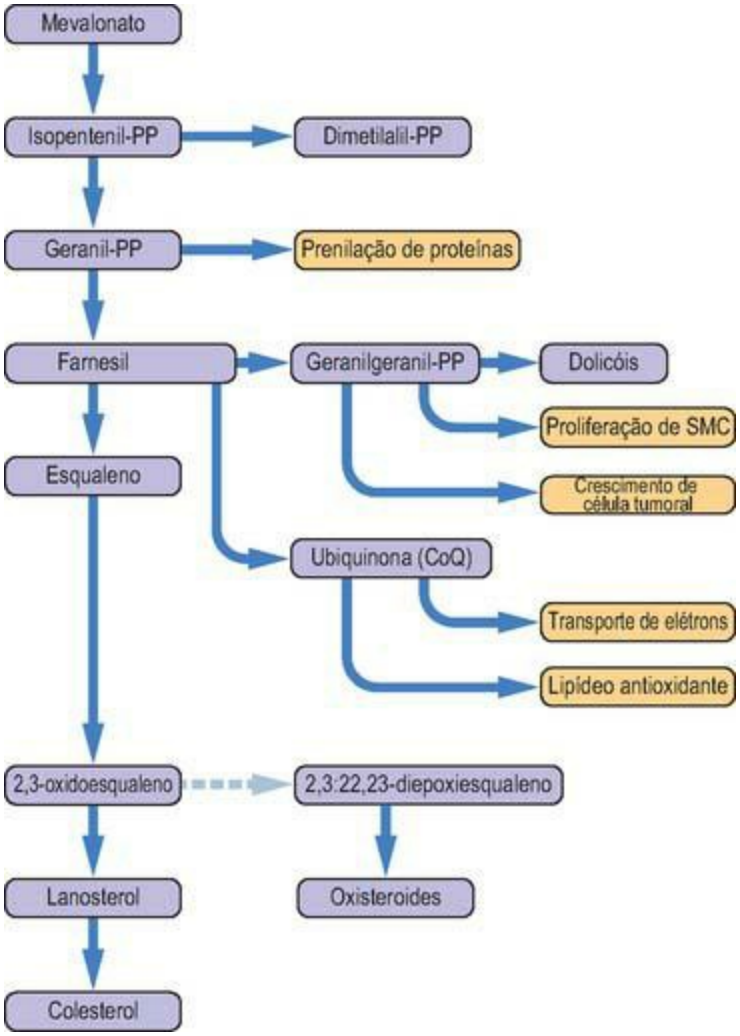


Fig. 17.1 Síntese de colesterol e vias relacionadas

*(modificado de Charlton-Menys V, Durrington PN. Exp. Physiol. 2007; **93**:27-42, com permissão). SMC, célula muscular lisa; CoQ, coenzima Q.*

ESTRUTURA DO COLESTEROL

A estrutura do colesterol é mostrada na Figura 17.2. Ele tem um peso molecular de 386 Da e contém 27 átomos de carbono, dos quais 17 são incorporados em quatro anéis unidos (núcleo ciclopentanoperidrofenantreno), dois estão em ângulo com grupos metil ligados nas junções dos anéis AB e CD e oito estão na cadeia lateral periférica. O colesterol é quase inteiramente composto por átomos de carbono e hidrogênio; existe um grupo hidroxil solitário ligado ao carbono 3. O colesterol também é quase completamente saturado, tendo somente uma dupla ligação entre os átomos de carbono 5 e 6.

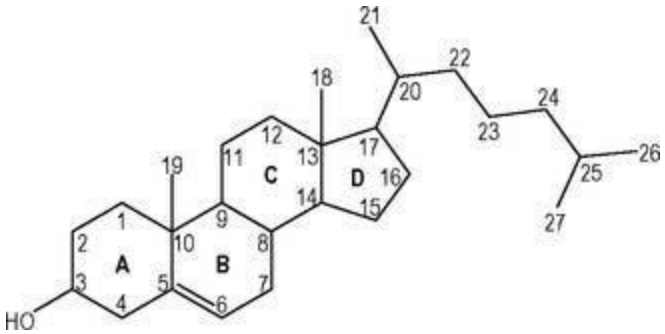


Fig. 17.2 Estrutura do colesterol. A-D é a notação convencional usada para descrever os quatro anéis. Números 1-27 descrevem os átomos de carbono.

O colesterol diminui a fluidez da membrana

O colesterol (principalmente o colesterol livre) é um componente essencial das membranas celulares. Ele é encontrado em maiores concentrações nas membranas plasmáticas (até 25% do conteúdo lipídico), enquanto está virtualmente ausente nas membranas internas mitocondriais. Ele é mantido na bicamada lipídica por interações físicas entre o anel esteroide planar e as cadeias de ácidos graxos. A ausência de ligação covalente significa que ele pode se transferir para dentro ou para fora da membrana. As membranas são estruturas fluidas nas quais ambas as moléculas de lipídeos e proteínas se movem e passam por mudanças conformacionais (Cap. 8). Quanto mais fluida a bicamada fosfolipídica for, mais permeável será a membrana. Na temperatura corporal, as cadeias longas de hidrocarbonetos da bicamada lipídica são capazes de movimentos consideráveis. O colesterol está localizado entre essas cadeias de hidrocarbonetos, formando interações fracas e assim reduzindo a fluidez. Esta rigidez relativa é aumentada ainda mais se o colesterol estiver adjacente a ácidos graxos saturados. O colesterol forma regiões de agregação dentro da bicamada lipídica. Em áreas de grupos de colesterol pode haver 1 mol de colesterol por 1 mol de fosfolipídeo, enquanto em áreas adjacentes pode não existir colesterol. Assim, a membrana contém áreas ricas em colesterol e impermeáveis e áreas sem colesterol e mais permeáveis.

COLESTEROL LIVRE E ESTERIFICADO

O colesterol é fracamente solúvel em água. Somente cerca de 30% do colesterol circulante ocorrem na forma livre, a maioria estando esterificada pelo grupo hidroxila a ácidos graxos de cadeia longa incluindo os ácidos oleico e linoleico. Os ésteres de colesterol são muito menos solúveis em água do que o colesterol livre.

O colesterol da dieta trazido ao fígado está na maior parte de forma livre. No plasma, o colesterol está incorporado às lipoproteínas (Cap. 18) e presente principalmente na forma de ésteres de colesterol. Os ésteres também são as formas teciduais de armazenamento do colesterol. O colesterol é esterificado no plasma pela enzima colesterol-lecitina aciltransferase e nas células pela acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT). Sessenta a oitenta por cento dos ésteres de colesterol presentes no plasma são absorvidos pelo fígado.

ABSORÇÃO INTESTINAL DE COLESTEROL

O colesterol da dieta é absorvido a partir dos intestinos via um transportador de membrana conhecido como proteína Nieman-Pick semelhante a C1 (NPC1L1). Outro transportador presente no lado apical dos enterócitos é o "cassette" ligante de ATP G5/G8, contendo dois meio transportadores – ABCG5 e ABCG8. Estes transportam o colesterol de volta ao lúmen do intestino e também estão envolvidos na secreção de esteroides não colesterol para a bile. A expressão destes transportadores é regulada positivamente pelo receptor nuclear, receptor hepático X (ver adiante). Mutações no gene que codifica para estes transportadores resultam em acúmulo tecidual de esteroides de plantas (sitosterolemia). O fármaco ezetimibe suprime o transporte de colesterol mediado por NPC1L1 e tem sido usado no tratamento da hipercolesterolemia.

BIOSSÍNTESE DE COLESTEROL

O colesterol é sintetizado a partir da acetil-coenzima A. A HMG-CoA redutase é a enzima limitante de velocidade da via

Virtualmente todas as células humanas têm a capacidade de fazer colesterol. O fígado é o principal local da biossíntese do colesterol, e pequenas quantidades são sintetizadas no intestino, córtex adrenal e gônadas. A geração das muitas ligações carbono-carbono e carbono-hidrogênio contidas na estrutura do colesterol requer uma fonte de átomos de carbono, uma fonte de força redutora e quantidades significantes de energia. A acetil-coenzima A (acetil-CoA) fornece o ponto de partida de alta energia. Ela pode ser derivada de várias fontes, incluindo a β-oxidação das cadeias longas de ácidos graxos, a desidrogenação de piruvato e a oxidação de aminoácidos cetogênicos, tais como leucina e isoleucina. A força redutora é fornecida pelo fosfato de nicotinamida dinucleotídeo reduzido (NADPH), que é gerado na via da pentose fosfato (Cap. 12).

HMG-CoA REDUTASE: UM EXEMPLO DE ENZIMA VELOCIDADE LIMITANTE DE UMA VIA

A HMG-CoA redutase é a enzima velocidade limitante na via da síntese de colesterol. Ela é uma enzima microssomal ativa no seu estado não fosforilado. A fosforilação por uma quinase inibe a sua atividade. Sua síntese é estimulada pelos níveis de colesterol no jejum ou na alimentação. Importante, a atividade da HMG-CoA redutase é controlada pela concentração intracelular de colesterol. Ela é influenciada também por vários hormônios: insulina e triiodotironina aumentam a sua atividade, enquanto glucagon e cortisol a inibem.

Energia adicional é fornecida pela quebra do trifosfato de adenosina (ATP). No total, a produção de 1 mol de colesterol necessita de 18 moles de acetil-CoA, 36 moles de ATP e 16 moles de NADPH. Todas as reações biossintéticas ocorrem dentro do citoplasma, embora algumas das enzimas necessárias estejam ligadas às membranas do retículo endoplasmático.

O ácido mevalônico é o primeiro composto na via da síntese do colesterol

Três moléculas de acetil-CoA são convertidas no 6-carbono ácido mevalônico (Fig. 17.3). O primeiro de dois passos são as reações de condensação levando à formação do 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Estas reações, catalisadas pela acetoacetil-CoA tiolase e HMG-CoA sintase, são comuns na formação dos corpos cetônicos, embora o último processo ocorra dentro da mitocôndria em vez do citosol. Estas reações também são favorecidas energeticamente já que envolvem a quebra da ponte tioéster e a liberação da coenzima-A livre. A reação limitante da velocidade na biossíntese do colesterol é aquela catalisada pela enzima microssomal HMG-CoA redutase que leva à formação irreversível de ácido mevalônico.

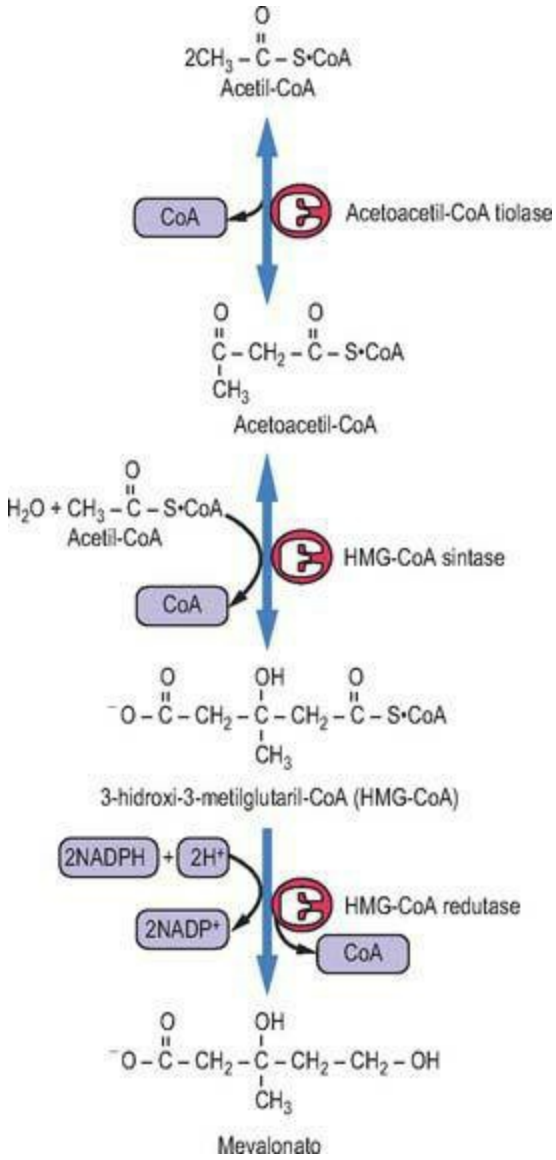


Fig. 17.3 Biossíntese do ácido mevalônico. O ácido mevalônico contém seis átomos de carbono, que são derivados de três moléculas de acetil-CoA.

Fármacos que inibem a HMG-CoA redutase (estatinas)

Os inibidores da HMG-CoA redutase, conhecidos como estatinas, são fármacos diminuidores de lipídeos que são usados para reduzir as concentrações de LDL circulantes em pacientes com, ou em, risco de doença cardiovascular aterosclerótica. Eles reduzem o colesterol por inibir competitivamente a enzima hepática. Isto causa uma redução na concentração intracelular de colesterol e, como resultado, aumento na expressão de receptores de LDL. A eliminação de LDL aumenta, e o colesterol-LDL circulante (e o colesterol total no plasma) diminui. A atividade da HMG-CoA redutase hepática está no seu pico cerca de seis horas após o escuro e no seu mínimo algumas seis horas após a exposição à luz. Por este motivo as estatinas normalmente são tomadas à noite para garantir um efeito máximo.

O farnesil pirofosfato é produzido de três unidades de isopreno

Três moléculas de ácido mevalônico são, cada uma, descarboxiladas em 3 unidades de isopreno com 5 átomos de carbono, que são sequencialmente condensadas para produzir a molécula de 15 átomos de carbono farnesil pirofosfato (Fig. 17.4). As duas primeiras reações necessitam de quinases e ATP para gerar o pirofosfato. Uma descarboxilação resulta nas unidades isopreno isoméricas isopentenil pirofosfato e dimetilalil pirofosfato, que se condensam para formar geranil pirofosfato.

Uma condensação adicional com o isopentenil pirofosfato produz o farnesil pirofosfato. Assim como sendo um intermediário na biossíntese do colesterol, o farnesil pirofosfato é o ponto de ramificação para a síntese de dolicol e ubiquinona (Fig. 17.1).

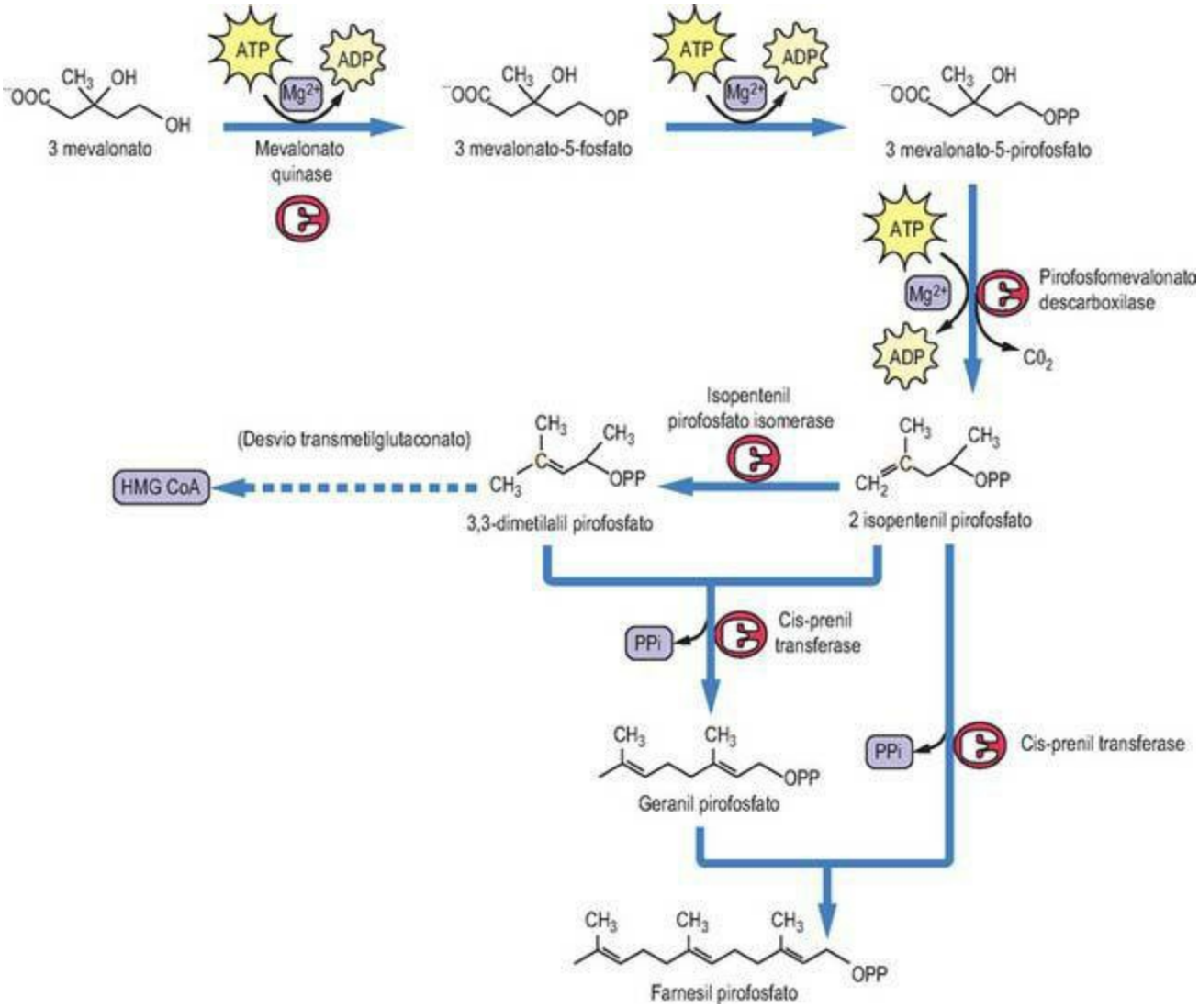


Fig. 17.4 Biossíntese do farnesil pirofosfato. O farnesil pirofosfato é composto de três unidades isopreno. ADP, adenosina difosfato; Mg^{2+}, magnésio; PPi, pirofosfato. Para o desvio transmetilglutaconato (consulte o quadro da pág. 209).

O esqualeno é uma molécula linear capaz de formar um anel

A esqualeno sintase é uma enzima presente no retículo endoplasmático que facilita a condensação de duas moléculas de farnesil pirofosfato (Fig. 17.5). Vários intermediários estão envolvidos, e o produto resultante é o esqualeno, um hidrocarboneto com 30 carbonos contendo seis duplas ligações, o que permite dobrar-se em um anel similar ao núcleo esteroide.

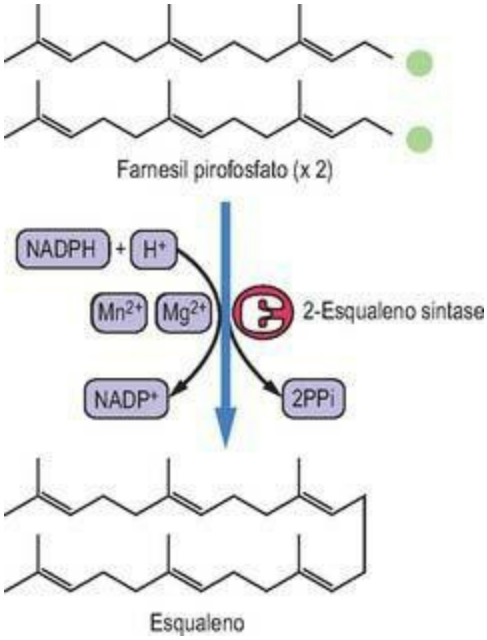


Fig. 17.5 Biossíntese do esqualeno. As seis duplas ligações permitem que a estrutura se dobre em um anel similar ao núcleo esteroide.

O esqualeno se cicliza em lanosterol

Antes do fechamento do anel, o esqualeno é convertido a esqualeno 2,3-óxido pela esqualeno mono-oxigenase no retículo endoplasmático. Daí em diante, a ciclização ocorre sob a ação da enzima oxidoesqualeno ciclase (Fig. 17.6). É interessante que, em plantas, existe um produto diferente da ciclização do esqualeno, conhecido como cicloartenol, que é metabolizado adicionalmente a uma variedade de fitoesteroides, incluindo o β-sitosterol, em vez de colesterol.

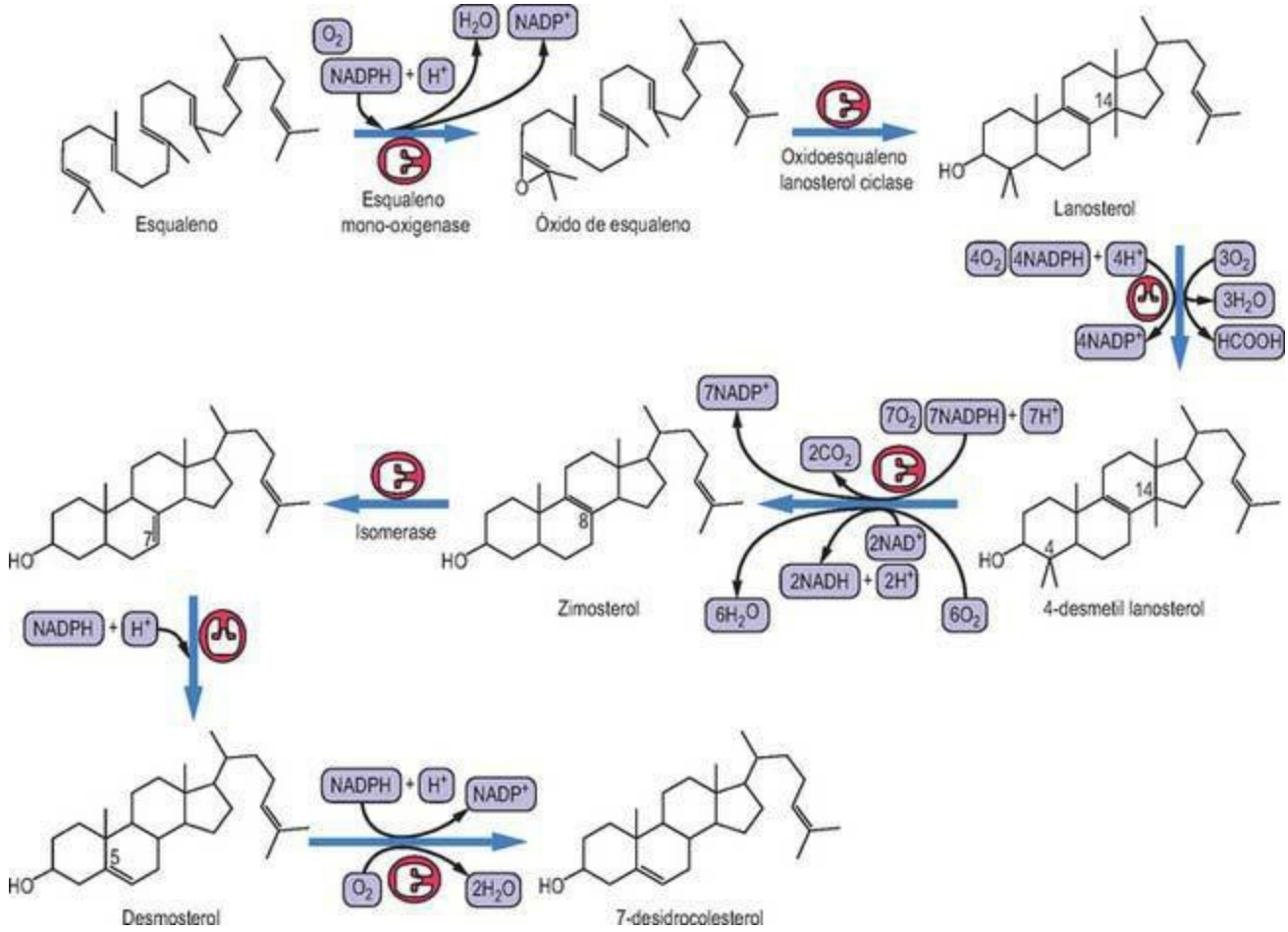


Fig. 17.6 Biossíntese do colesterol. Estas reações ocorrem enquanto ligadas à proteína ligante de esqualeno e esteroides. FAD, flavina adenina dinucleotídeo; NADH, nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida.

Os estágios finais da biossíntese do colesterol ocorrem em uma proteína transportadora

O esqualeno, o lanosterol e todos os intermediários seguintes são moléculas hidrofóbicas. A fim de que os passos finais da via ocorram em um meio aquoso, os intermediários reagem enquanto ligados à proteína ligante de esqualeno e esteroides. A conversão do lanosterol de 30 carbonos em colesterol de 27 carbonos envolve três reações de descarboxilação, uma isomerização e uma redução (Fig. 17.6). O NADPH é consumido em quatro dessas reações.

Regulação da biossíntese do colesterol

Muitos fatores estão envolvidos na regulação da concentração intracelular do colesterol (Tabela 17.1). Sob circunstâncias normais, existe uma relação inversa entre a ingestão de colesterol pela dieta e a sua biossíntese. Isto garante um aporte diário relativamente constante de colesterol. Isto também explica por que uma restrição na dieta parece exercer uma redução moderada na concentração plasmática de colesterol.

Tabela 17.1 Regulação do colesterol intracelular (Fig. 17.1)

Regulaçâo do colesterol intracelular
Fatores que aumentam a concentração intracelular de colesterol livre
biossintese *de novo*
hidrólise dos ésteres de colesterol intracelulares pela enzima colesterol éster hidrolase
ingestão na dieta de colesterol e absorção dos quilomícrons
absorção das lipoproteínas contendo colesterol (LDL)
Fatores que reduzem a concentração intracelular de colesterol livre
inibição da biossintese de colesterol
regulação negativa do receptor de LDL
esterificação intracelular do colesterol pela aci-coenzima A:colesterol acil transferase

liberação de colesterol para as lipoproteínas de alta densidade (HDL)
conversão do colesterol a ácidos biliares ou hormônios esteroides
Fatores que influenciam a atividade da HMG-CoA redutase
concentração intracelular de HMG-CoA
concentração intracelular de colesterol
hormônios: insulina, tri-iodotironina (+); glucagon, cortisol (-)

Existem duas fontes de colesterol intracelular: a síntese *de novo* e o fornecimento externo. O colesterol exógeno (da dieta) alcança as células predominantemente como um componente das VLDL remanescentes e das LDL (Cap. 18). Estas lipoproteínas se ligam ao receptor apoB/E presente nas membranas plasmáticas e os complexos lipoproteína/receptor são internalizados. No citoplasma, as vesículas carregando os complexos internalizados são atacadas por enzimas lisossomais, as quais separam as LDL da molécula do receptor e hidrolisam os ésteres de colesterol. O colesterol livre é liberado para o citoplasma. A apoproteína LDL é hidrolisada aos seus aminoácidos componentes.

TRATAMENTO DA HIPERCOLESTEROLEMIA

A despeito de um controle rígido da dieta, um homem de 50 anos de idade, com história familiar de doença cardiovascular precoce, apresentou um resultado de colesterol sérico de 8,0 mmol/L (309 mg/dL); (níveis desejáveis <4,0 mmol/L (≤155 mg/dL) (Cap. 18). Ele também fumava 15 cigarros por dia. Foi então aconselhado a parar de fumar, e prescrita uma estatina. Ele tolerou bem a terapia e três meses depois seu colesterol era de 5,5 mmol/L (212 mg/dL). A dose de estatina foi aumentada e após mais três meses sua concentração de colesterol era de 4,1 mmol/L (158 mg/dL).

Comentário. A inibição parcial da HMG-CoA redutase levou a uma redução do colesterol plasmático total em cerca de 30-50% e do LDL-colesterol em 30-60%. Uma variedade de estatinas está agora disponível: elas seguem a descoberta original de que a compactina (posteriormente renomeada para mevastatina), um metabólito de fungo isolado do *Penicillium citrinun*, tinha propriedades inibitórias da HMG-CoA redutase. A inibição na atividade da HMG-CoA redutase leva a uma redução na concentração intracelular de colesterol e um consequente aumento da expressão do receptor apo B/E (Cap. 18) e à redução no LDL-colesterol plasmático.

Assim, o colesterol intracelular livre pode ou ser derivado das lipoproteínas ou ser recém-sintetizado dentro da célula. Estas duas fontes de fornecimento estão reciprocamente relacionadas. Um fator-chave regulando a síntese celular de colesterol é a sua concentração intracelular. O aumento da concentração intracelular de colesterol livre resulta no seguinte (Fig. 17.7):

- uma redução em ambas as atividades e expressão da HMG-CoA redutase, limitando mais síntese de colesterol.
- regulação negativa dos receptores de LDL, limitando mais entrada celular de colesterol.
- aumento no efluxo de colesterol e fosfolipídeo da célula para as apoproteínas A.

aumento na taxa de conversão de colesterol para ácidos biliares e então sua excreção.

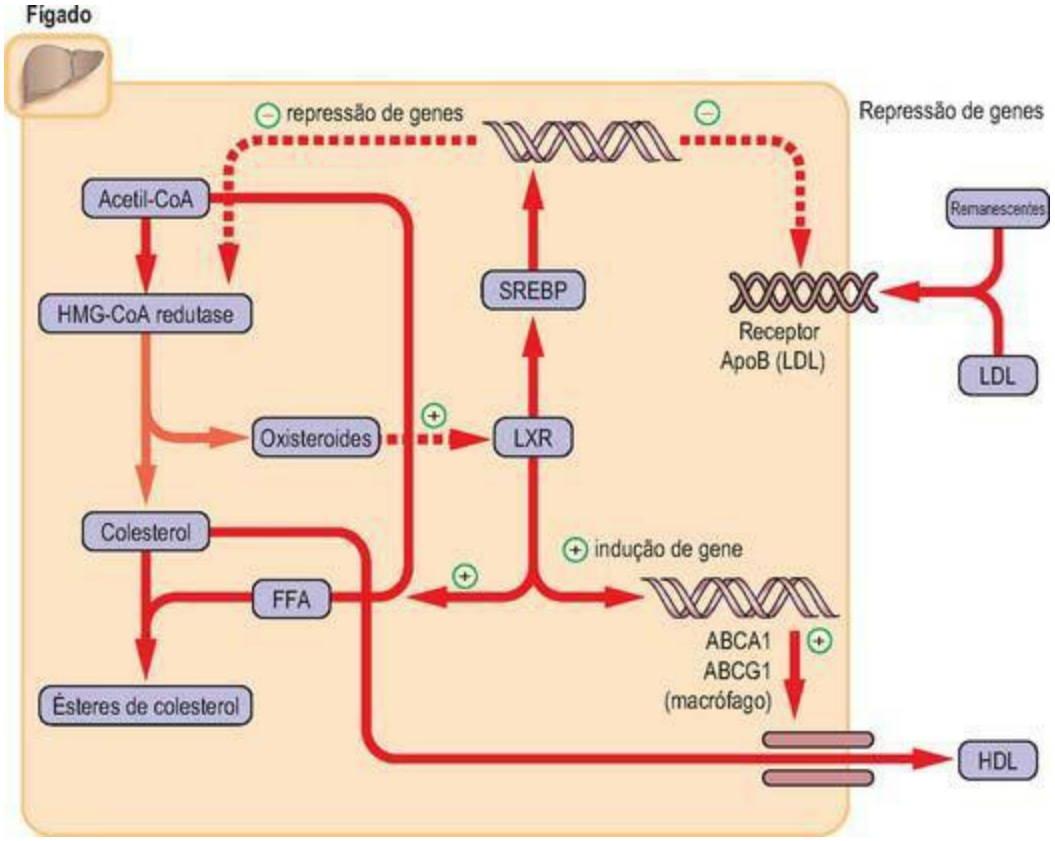


Fig. 17.7 Regulação da concentração intracelular de colesterol. O colesterol livre (e os oxisteroides) regula a concentração intracelular de colesterol pela ligação com receptores nucleares e induzindo ou suprimindo a expressão de genes. Lembre que o aumento na concentração intracelular de colesterol irá suprimir a síntese da HMG-CoA redutase e do receptor ApoB/E e também aumentar a esterificação de colesterol e seu transporte das células. FFA: ácidos graxos livres; AcCoA: acetil coenzima A; LXR: receptor X do fígado; SREBP: proteína ligante do elemento regulador de esteróis.

O DESVIO PARA TRANSMETILGLUTACONATO

O dimetilalil pirofosfato, uma das unidades isopreno formadas a partir do mevalonato (Fig. 17.4), pode ser desfosforilado e quebrado em acetoacetato e acetil-CoA, que podem então ser desviados para outras vias, tais como a biossíntese de ácidos graxos. Este mecanismo é conhecido como o desvio transmetilglutaconato. Assim, compostos de alta energia, uma vez destinados a serem convertidos em colesterol, podem ser alterados para satisfazer necessidades de maior prioridade. Incidentalmente, um aumento na síntese de ácidos graxos irá aumentar a quantidade de substrato para a esterificação do colesterol.

DEFEITO NA BIOSSÍNTESE DE COLESTEROL (INCIDÊNCIA DE 1 EM 20.000-40.000)

A síndrome de Smith-Lemli-Opitz se apresenta ao nascimento com microcefalia, seio nasal curto, queixo pequeno, palato arcado alto e frequentemente com fissura na linha média. Frequentemente é acompanhada por defeitos no sistema nervoso central (CNS), polidactilia e, em homens, genitália

ambígua. A despeito da via de síntese e metabolismo do colesterol ser bem compreendida, um defeito na 7-desidrocolesterol redutase só foi identificado em 1993. Enquanto algumas dessas crianças morrem na infância, o restante, se assistidos na sua alimentação, sobrevive com retardo mental severo (QI 20-40). A maioria desenvolve retardo no crescimento. A patofisiologia envolve processamento incompleto das proteínas embrionárias de sinalização (proteínas HH), resultando em defeitos variáveis em diferentes tecidos. O tratamento envolve administração adicional de colesterol à criança. Isto melhora o crescimento, mas parece não ter benefícios no CNS, devido à microcefalia embrionária e a outros defeitos no CNS.

Regulação da concentração intracelular de colesterol envolve a HMG-CoA redutase, o receptor de LDL, a 7α-hidroxilase e uma rede de receptores nucleares

Os receptores X do fígado (LXR) são fatores de transcrição ativados por ligantes que são membros da superfamília de receptores nucleares (Cap. 40). Eles formam heterodímeros com outras moléculas similares, tais como receptores X de retinoides (RXRs) e os receptores X de farnesil (FXR). Os complexos resultantes se ligam aos elementos de resposta LXR no DNA regulando a expressão gênica.

O LXR detecta a concentração intracelular de colesterol e regula sua síntese e seu efluxo das células. Curiosamente, não é o próprio colesterol que se liga ao LXR, mas oxiesteroides, metabólitos do colesterol, tais como o 25-hidroxicolesterol ou o 27-hidroxicolesterol (Fig. 17.1).

A ativação do LXR pelo ligante resulta em regulação positiva da síntese dos fatores de transcrição conhecidos como proteínas ligantes de elementos reguladores de esteroides (SREBPs). Os SREBPs são sintetizados como precursores integrais para a membrana do retículo endoplasmático. Eles são clivados por uma protease para liberar os fatores de transcrição ativos, que se translocam para o núcleo e iniciam a transcrição (Fig. 17.7).

Existe uma outra molécula intermediária, a proteína ativadora da quebra de SREBP (SCAP) que possui um domínio sensor de esteroides e carreia o precursor SREBP para a sua protease ativa. Este passo é regulador porque é bloqueado pelos esteroides. Assim, quando a concentração intracelular de colesterol está alta, os genes de transcrição associados com a síntese do colesterol são reprimidos. Por outro lado, quando os esteroides estão ausentes, o complexo SCAP/SREBP alcançam a protease e a transcrição se inicia. As SREBPs agem nas regiões promotoras dos genes da HMG-CoA redutase, da HMG-CoA sintase e do receptor de LDL.

Além da repressão da síntese intracelular de colesterol, sua concentração aumentada no hepatócito induz também, via LXR, genes que codificam para os transportadores de colesterol que controlam seu efluxo das células para as partículas de HDL. Isto inclui a expressão de ABCA1 (um transportador que controla o efluxo de colesterol das células para o HDL nascente) e de ABCG1 (um transportador que estimula o efluxo de colesterol para HDL2 e HDL3 mais maduras; Cap. 18). Note que o fator de transcrição PPARγ também age através do LXR regulando o efluxo de colesterol (Cap. 18). Finalmente, a alta concentração intracelular de colesterol, também através de uma das SREBPs, induz as enzimas que catalisam a síntese de ácidos graxos, fornecendo substratos para a esterificação do colesterol.

ÁCIDOS BILIARES

O fígado remove o colesterol ou em forma livre ou como ácidos biliares

Quantitativamente, os ácidos biliares são os produtos metabólicos do colesterol mais importantes. No homem, existem quatro principais ácidos biliares (Fig. 17.8). Todos eles têm 24 átomos de carbono com os três átomos de carbono terminais da cadeia lateral do colesterol sendo removidos durante a síntese. Eles também têm um núcleo esteroide saturado e diferem somente no número e posição dos grupos hidroxila adicionais. Todos estes grupos hidroxila têm a configuração α (abaixo do plano do núcleo) e isto significa que a isomerização do grupo hidroxila 3β do colesterol deva ocorrer.

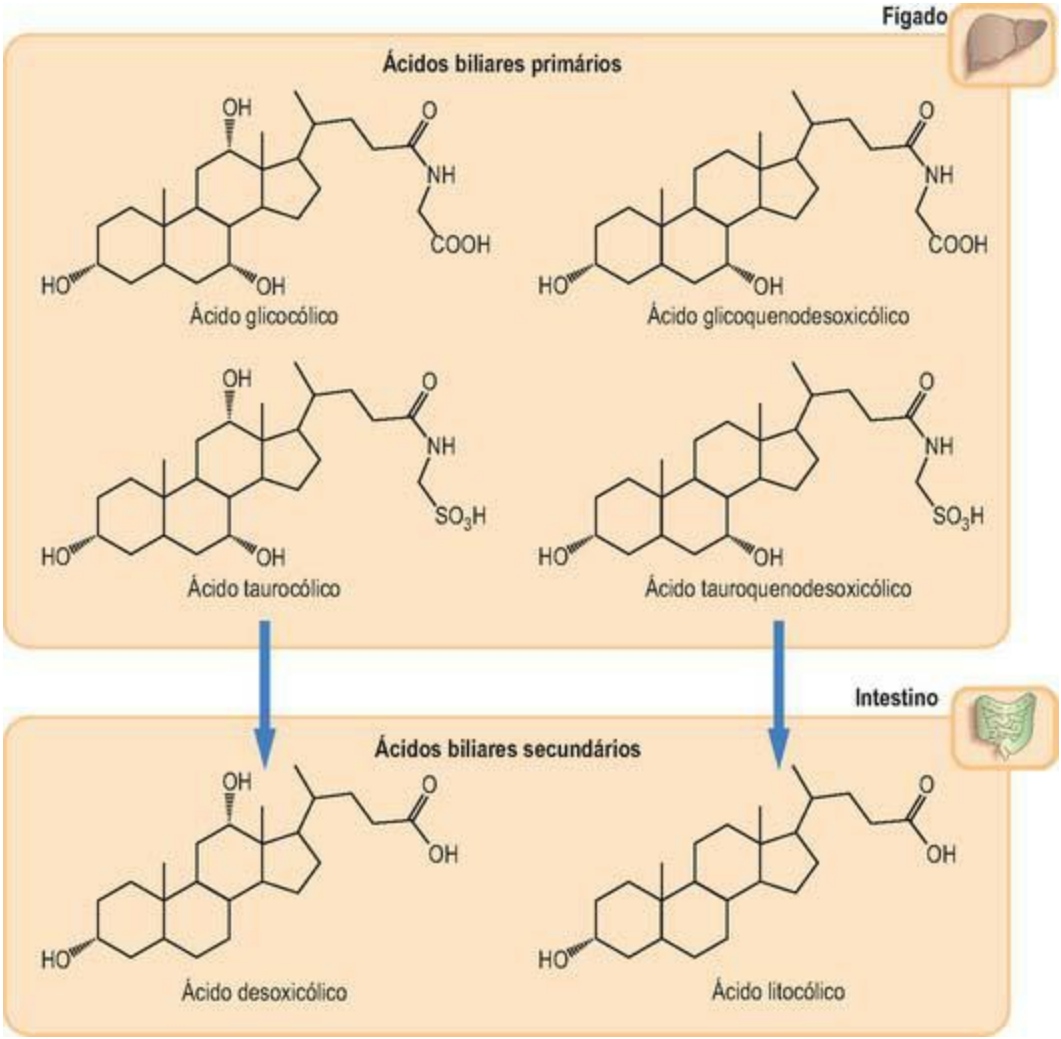


Fig. 17.8 Estrutura dos ácidos biliares. Os ácidos biliares primários são sintetizados no fígado, e os ácidos biliares secundários no intestino.

Os ácidos biliares são sintetizados no fígado

A biossíntese dos ácidos biliares ocorre nas células parenquimatosas do fígado, onde os ácidos cólico e quenodes oxicólico são produzidos. Eles são conhecidos como os ácidos biliares primários. O passo limitante na biossíntese é a enzima microssomal 7α-hidroxilase (também designada como CYP7A1), que introduz um grupo hidroxil na posição 7α do anel do colesterol. Ela é uma mono-

oxigenase microssomal que consiste de citocromo P-450 e necessita de NADPH e oxigênio molecular.

Antes da sua secreção, os ácidos biliares primários são conjugados através do grupo carboxila, formando ligações amida com glicina ou taurina (Fig. 17.8). No homem, existe uma razão 3:1 em favor dos conjugados de glicina. Os produtos secretados são assim, principalmente os ácidos glicocólico, glicoquenodesoxicólico, taurocólico e tauroquenodesoxicólico. No pH fisiológico, os ácidos biliares estão principalmente ionizados, assim eles ocorrem como sais de sódio ou potássio. Os termos "ácidos biliares" e "sais biliares" são usados intercambiavelmente. Como seus nomes sugerem, estes compostos são secretados a partir do fígado, via canalículos biliares e ductos biliares maiores, ou diretamente no duodeno ou armazenados na vesícula biliar. Eles são importantes componentes da bile junto com água, fosfolipídeos, colesterol e produtos excretórios, tais como a bilirrubina. O colesterol é bombeado para a bile pelas proteínas ABCG5 e ABCG8, cuja expressão é regulada pelo LXR (ver anteriormente). Importante, a bile saturada com colesterol facilita a formação de pedras de colesterol na vesícula.

CÁLCULOS BILIARES

Uma mulher de 45 anos de idade se queixa de dor abdominal no quadrante superior direito e vômitos após alimentos gordurosos. A única anormalidade bioquímica foi um aumento moderado na fosfatase alcalina para 400 U/L (<260 U/L). Entretanto, um ultrassom abdominal mostrou que a vesícula biliar continha cálculos biliares. Ela foi encaminhada ao cirurgião.

Comentário. Os cálculos biliares ocorrem em até 20% da população dos países do ocidente. A condição resulta da formação de pedras ricas em colesterol dentro da vesícula biliar. O colesterol está presente em altas concentrações na bile, estando solubilizado em micelas que também contêm fosfolipídeos e ácidos biliares. Quando o fígado secreta a bile com uma razão colesterol para fosfolipídeo maior do que 1:1, torna-se difícil solubilizar todo o colesterol nas micelas; assim, existe uma tendência para o excesso se cristalizar em torno de qualquer núcleo insolúvel. Isso é reforçado por maior concentração da bile na vesícula biliar que ocorre como resultado da reabsorção de água e eletrólitos. A condição pode ser controlada cronicamente através da redução do colesterol da dieta e aumento da disponibilidade de ácidos biliares que irão auxiliar na solubilização do colesterol na bile e excreção via intestinos. O tratamento alternativo inclui a desintegração das pedras por ondas de choque (litotripsia) e cirurgia. A fosfatase alcalina elevada é um marcador da colestase (Cap. 29).

Os receptores X participam na síntese e secreção de bile

Os receptores X coordenam a expressão de vários genes relevantes para a excreção de colesterol incluindo a expressão da colesterol 7α-hidroxilase. A excreção de colesterol para a bile também é regulada por outros receptores nucleares. O receptor X de farnesil (FXR) se heterodimeriza com o receptor X de retinoides e se liga aos elementos de resposta do ácido biliar no DNA. O FXR age como sensor celular do ácido biliar através da ligação do ácido biliar e suprimindo suas sínteses. O FXR também induz a bomba de exportação de ácido biliar ABCBII que remove os ácidos biliares do hepatócito para a bile.

Os ácidos biliares secundários são formados no intestino

Os ácidos biliares secundários se formam dentro do intestino pela ação de bactéria anaeróbica

(principalmente *Bacteroides*) nos ácidos biliares primários. Eles são os ácidos desoxicólico e litocólico (Fig. 17.8). Somente uma proporção dos ácidos biliares primários é convertida em ácidos biliares secundários. Isto necessita de hidrólise da ligação amida à glicina ou taurina antes da remoção do grupo 7α-hidroxila.

Os ácidos biliares ajudam na digestão da gordura da dieta

A secreção de bile a partir do fígado e o esvaziamento do ducto biliar são controlados pelos hormônios gastrointestinais hepatocrinina e colecistocinina, respectivamente. Eles são liberados quando o alimento parcialmente digerido passa do estômago para o duodeno. Uma vez secretados no intestino, os ácidos biliares agem como detergentes (eles possuem grupos polares carboxila e hidroxila), auxiliando na emulsificação dos lipídeos digeridos; isto ajuda a digestão enzimática e a absorção da gordura da dieta (Cap. 10).

Os ácidos biliares recirculam via circulação êntero-hepática

Até 30 g de ácidos biliares passam do ducto biliar para dentro do intestino a cada dia, mas somente 2% disto (aproximadamente 0,5 g) são perdidos pelas fezes. A maioria seria desconjugada e reabsorvida. A reabsorção passiva dos ácidos biliares ocorre no jejuno e cólon, mas a maioria tem lugar no Íleo por transporte ativo. Os ácidos biliares reabsorvidos são transportados no sangue via a veia portal ligados não covalentemente à albumina e são novamente secretados na bile. O processo é conhecido como circulação êntero-hepática. A reabsorção intestinal explica por que a bile contém ambos os ácidos biliares primários e secundários. O conjunto total de ácidos biliares é de somente 3 g, e por este motivo eles têm de recircular 5-10 vezes ao dia.

Este fluxo de ácido biliar também contribui para o controle da síntese de ácidos biliares; a 7α-hidroxilase está sob controle por retroalimentação pela quantidade de ácidos biliares que retornam ao fígado através da veia porta. Os ácidos biliares da dieta também reduzem a expressão da 7α-hidroxilase. O metabolismo dos ácidos biliares está resumido na Figura 17.9.

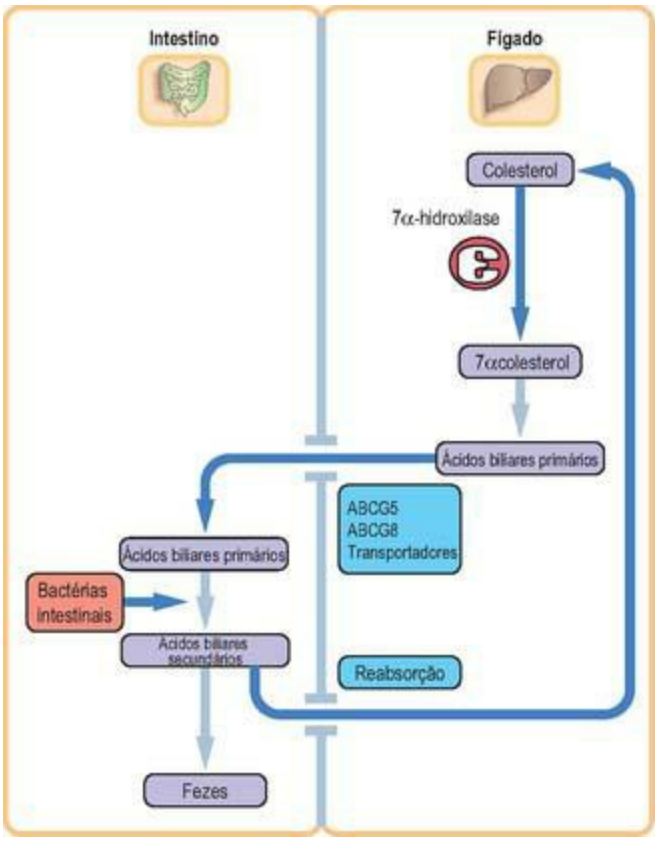


Fig. 17.9 Circulação êntero-hepática dos ácidos biliares. Para a estrutura dos ácidos biliares primários e secundários, veja a Figura 17.7.

O colesterol é excretado nas fezes

Assim, existe um considerável fluxo de colesterol do fígado para a bile e então para o duodeno. Cerca de 1 g de colesterol é eliminado do corpo a cada dia através das fezes. Aproximadamente 50% disto são excretados como ácidos biliares e o restante como os esteroides neutros isoméricos saturados coprostanol (5β-) e o colestanol (5α-) produzidos pela redução bacteriana da molécula de colesterol.

A colestiramina é uma resina ligante de ácido biliar que tem sido usada para reduzir o colesterol plasmático

A colestiramina é um fármaco que interrompe a circulação êntero-hepática de ácidos biliares. Ela leva a um aumento na atividade da 7α-hidroxilase, síntese aumentada de ácidos biliares e excreção aumentada de ácidos biliares. Consequentemente existe uma síntese aumentada de colesterol e uma expressão aumentada do receptor de LDL. A colestiramina foi um dos primeiros agentes efetivos e redutores de colesterol, mas tem sido substituída pelas estatinas. O mais novo fármaco redutor de lipídeo que age no intestino é o azetimibe, mencionado anteriormente.

HORMÕNIOS ESTEROIDES

O colesterol é o precursor de todos os hormônios esteroides

Os mamíferos produzem muitos hormônios esteroides, alguns dos quais diferem somente por uma dupla ligação ou pela orientação de um grupo hidroxila. Consequentemente foi necessário o uso de nomenclatura sistemática para detalhar as estruturas exatas. Existem três grupos de hormônios esteroides (Fig. 17.10). Os corticosteroides têm 21 átomos de carbono na estrutura básica do anel de pregnano. A perda dos dois átomos de carbono restantes da cadeia lateral do colesterol produz o anel androstano e o grupo de hormônios conhecidos como androgênios. Finalmente, a perda adicional do grupo metila angular no átomo de carbono 19 como parte da aromatização do anel A resulta na estrutura estrano encontrada nos estrogênios. A presença e posição de duplas ligações e a posição e orientação do grupo hidroxila ou outros grupos funcionais no núcleo básico são características particulares de cada hormônio.

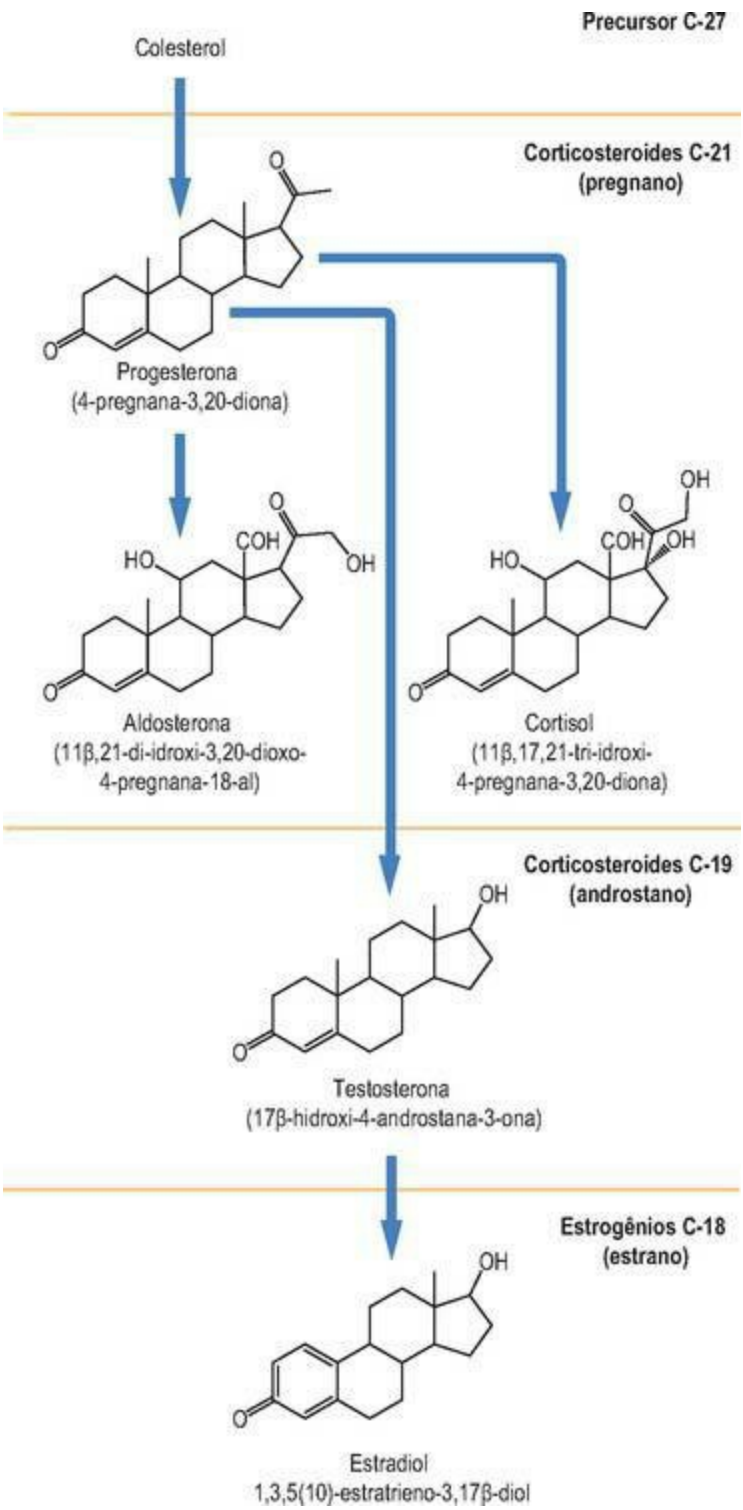


Fig. 17.10 Estrutura e nomenclatura dos hormônios esteroides humanos mais importantes. São mostrados seus nomes triviais e sistemáticos (em parênteses). Para a numeração dos átomos em uma molécula esteroide (Fig. 17.1 e Cap. 39).

A MEDIDA DE ESTEROIDES POR CROMATOGRAFIA GASOSAESPECTROMETRIA DE MASSA (GC/MS)

No laboratório de endocrinologia clínica, a medida dos metabólitos esteroides urinários ajuda no diagnóstico de um número de distúrbios herdados da síntese e metabolismo de esteroides adrenais e tumores produtores de esteroides. Isto é particularmente valioso na identificação do local do defeito na hiperplasia adrenal congênita. Estas investigações são mais frequentemente realizadas em

neonatos com genitália ambígua, crianças com puberdade precoce e em pacientes com suspeita de síndrome de Cushing (Cap. 39). As anormalidades na síntese de esteroides são reveladas por uma alteração no padrão dos metabólitos esteroides urinários.

A técnica usada é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS); ela é muito similar ao método adotado para a identificação de esteroides anabolizantes no esporte. Os metabólitos esteroides são excretados na urina principalmente como conjugados com sulfato ou ácido glicurônico hidrossolúveis. O primeiro passo na análise envolve a liberação enzimática dos esteroides de seus conjugados; isso é seguido por derivatização química para aumentar suas estabilidades e melhorar a separação, que é realizada por cromatografia de gás em colunas capilares a altas temperaturas. A detecção final é por fragmentação de massa: para cada metabólito esteroide, um único padrão de fragmentação iônica é obtido, o que permite a identificação positiva e a quantificação.

DEFICIÊNCIA DE ESTEROIDE 21-HIDROXILASE

Uma criança nasceu com genitália ambígua. Dentro de 48 horas a criança estava hipotensa e em sofrimento. A investigação bioquímica revelou:

- Na^+ 115 mmol/L (135-145 mmol/L)
- K^+ 7,0 mmol/L (3,5-5,0 mmol/L)
- 17-hidroxiprogesterona 550 nmol/L (<50 nmol/L)

Comentário. Este neném tem uma forma severa de deficiência de esteroide 21-hidroxilase, a mais comum de um grupo de condições caracterizadas por defeitos na atividade de uma das enzimas da via esteroidogênica, conhecida como hiperplasia adrenal congênita. A condição tem uma origem genética e leva à falência na produção de cortisol (e possivelmente também aldosterona). Isto resulta em inibição reduzida na retroalimentação negativa na produção de ACTH pela pituitária. O ACTH continua a estimular a glândula adrenal a produzir esteroides anteriores ao bloqueio da enzima. Os esteroides incluem a 17-hidroxiprogesterona, que é ainda metabolizada à testosterona (Fig. 17.10). Isto resulta em androgenização de uma recém-nascida menina. A deficiência de mineralocorticoide causa eliminação renal de sal e necessita de tratamento urgente com esteroides e fluidos. A terapia de manutenção de longo prazo com hidrocortisona e mineralocorticoides suprime a produção de ACTH e androgênios. Uma forma menos severa desta condição, uma deficiência parcial da enzima, ocorre em mulheres jovens que apresentam irregularidade menstrual e hirsutismo como consequência do excesso de androgênios adrenais.

Biossíntese dos hormônios esteroides

A conversão do colesterol em hormônios esteroides ocorre somente em três órgãos: o córtex adrenal, os testículos nos homens e o ovário nas mulheres.

Uma simplificação usada na prática é se considerar os corticosteroides como produtos do córtex adrenal, androgênios como os produtos dos testículos e estrogênios como produtos do ovário. Uma via simplificada da síntese dos esteroides é mostrada na Figura 17.11 (Cap. 39). A atividade relativa das enzimas esteroidogênicas em cada um desses três órgãos determina o principal produto secretado; entretanto, isto não é regra e todos os três órgãos são capazes de secretar pequenas quantidades dos esteroides pertencentes aos outros grupos. Em situações patológicas, tais como um defeito na esteroidogênese ou um tumor secretor de esteroides, um padrão muito anormal de secreção de esteroides pode ocorrer.

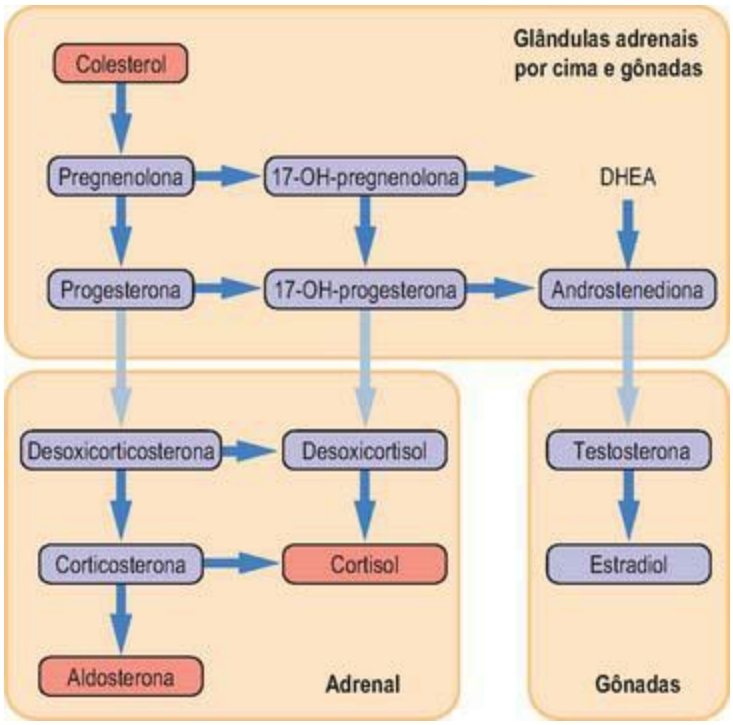


Fig. 17.11 Via biossintética de esteroides. Note como a via se ramifica a partir do colesterol, levando circunstancialmente à síntese de mineralocorticoides (p. ex., aldosterona), glicocorticoides (cortisol), androgênios (testosterona) e estrogênios (estradiol).

As enzimas mono-oxigenases citocromo P-450 controlam a esteroidogênese

A maioria das enzimas envolvidas na conversão do colesterol em hormônios esteroides são as proteínas do citocromo P-450, que necessitam de oxigênio e NADPH. Em sua forma mais simples, este complexo enzimático catalisa a substituição de uma ligação carbono-hidrogênio com uma ligação carbono-hidroxila; por isso, o termo coletivo ser mono-oxigenase. A hidroxilação dos átomos de carbono adjacentes é o precursor da quebra da ligação carbono-carbono. A comparação da estrutura do colesterol (Fig. 17.2) com aquelas dos hormônios esteroides (Fig. 17.10) demonstra que a via biossintética é amplamente realizada pela quebra de ligações carbono-carbono e reações de hidroxilação. As enzimas envolvidas têm suas próprias nomenclaturas nas quais o símbolo CYP é seguido por um sufixo específico. Assim, CYP21A2 se refere à enzima que hidroxila o átomo de

carbono 21 (Cap. 29).

Corticosteroides

A subestrutura celular do córtex adrenal é organizada em três camadas. As duas camadas internas (*zona fasciculata* e *zona reticularis*) são responsáveis pela síntese de cortisol (o principal glicocorticoide) e androgênios adrenais. A camada externa (*zona glomerulosa*) é responsável pela síntese da aldosterona, o principal mineralocorticoide (Cap. 23). Embora muitas das etapas sejam similares, elas são controladas por mecanismos muito diferentes.

A biossíntese do cortisol depende da estimulação pelo hormônio pituitário adrenocorticotrófico (ACTH) que se liga ao seu receptor de membrana e dispara um grupo de eventos intracelulares que causam a hidrólise dos ésteres de colesterol armazenados em gotículas de lipídeos e a ativação da enzima colesterol 20,22-desmolase que converte o C-27 colesterol em pregnenolona, a primeira da família C-21 pregnana dos corticoides. Esta é a etapa velocidade limitante da esteroidogênese. Depois disso, a conversão do cortisol necessita da desidrogenação-isomerização e três reações sequenciais de hidroxilação em C-17, -21 e -11, sob o controle das enzimas CYP. O controle da velocidade de biossíntese de cortisol é obtido por retroalimentação negativa pelo cortisol na secreção de ACTH (Cap. 39).

O principal estímulo para a síntese de aldosterona não é o ACTH, mas a angiotensina II (Cap. 23). O potássio é um importante estímulo secundário. A angiotensina II, por ligação ao seu receptor, e o potássio trabalham cooperativamente para ativar a primeira etapa da via: a conversão de colesterol em pregnenolona. A *zona glomerulosa* carece de 17α-hidroxilase, mas tem quantidades abundantes da 18-hidroxilase que catalisa a primeira reação de dois estágios, formando o grupo 18-aldeído encontrado na aldosterona.

Androgênios

A conversão dos corticoides em androgênios necessita da 17-20 liase/desmolase e um substrato que contém o grupo 17α-hidroxila. Isto estimula a adição de um grupo 17α-hidroxila antes da quebra da ligação C17-C20 para produzir a estrutura do anel androstano. Esta enzima é abundante nas células de Leydig dos testículos e nas células da granulosa do ovário. Nesses casos, entretanto, a etapa limitante na quebra da cadeia lateral do colesterol é estimulada pelo hormônio luteinizante (LH) nos testículos e pelo hormônio folículo estimulante (FSH) nos ovários. Assim, em dois tecidos diferentes o mesmo passo biossintético é controlado por dois hormônios diferentes.

Estrogênios

A conversão dos androgênios em estrogênios envolve a remoção do grupo metila em C-19 pela 19-aromatase (Fig. 39.7). O anel A passa por duas desidrogenações como parte da reação, produzindo o núcleo 1,3,5(10)-estratrieno característico. Esta aromatase é mais abundante nas células da granulosa do ovário, embora a enzima do tecido adiposo também possa converter alguma testosterona em estradiol. As ações biológicas dos hormônios esteroides são diversas e são melhor consideradas como pertencentes ao sistema de hormônios trópicos. Esse sistema é descrito no capítulo 39. Muitos defeitos genéticos foram identificados na estrutura das enzimas CYP – estes defeitos levam à biossíntese anormal de esteroides e a distúrbios clínicos, tais como hiperplasia adrenal congênita.

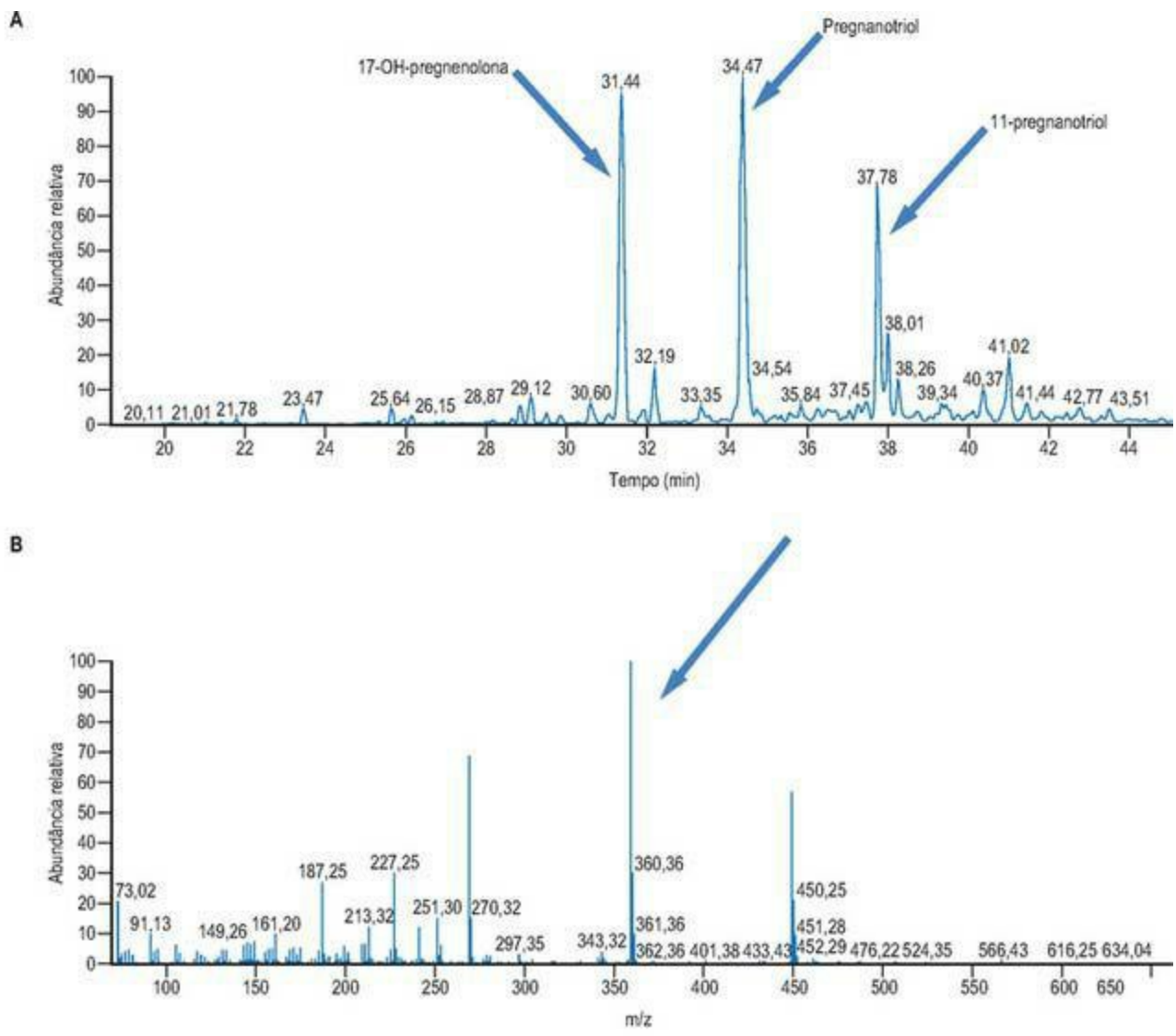
Mecanismo de ação e eliminação dos hormônios esteroides

Os hormônios esteroides agem via receptores nucleares

Todos os hormônios esteroides agem pela ligação aos receptores nucleares ativados por ligante. Os receptores de hormônios esteroides pertencem à superfamília de receptores hormonais, que incluem os receptores para o hormônio T3 da tireoide e as formas ativas das vitaminas A e D (capítulo 40). A especificidade de cada receptor é alcançada através das diferentes cavidades hidrofóbicas em um pequeno domínio ligante de hormônio. Adjacente ao domínio ligante de hormônio está um domínio ligante de DNA altamente conservado, que é caracterizado pela presença de dois *zinc fingers* (Fig. 34.3). A ligação do esteroide facilita a translocação do receptor ativado para o núcleo e à ligação a um elemento específico de resposta ao esteroide nas regiões promotoras dos genes-alvo, levando à transcrição (Cap. 34). A variabilidade genética na estrutura dos receptores esteroides pode transmitir um grau variável de resistência hormonal e diversas apresentações clínicas. As ações biológicas dos hormônios esteroides são melhor consideradas como parte do sistema de hormônios trópicos descrito no capítulo 39.

Os hormônios esteroides são excretados na urina

A maioria dos hormônios esteroides é excretada pelos rins. Existem duas vias principais neste processo. Primeiro, a potência biológica do esteroide tem que ser removida e isto é conseguido por uma série de reações de redução. Segundo, a estrutura esteroide tem que se tornar hidrossolúvel, conseguido pela conjugação a um grupo glicuronídio ou sulfato, geralmente através do grupo hidroxila em C-3. Como resultado, muitos conjugados de hormônios esteroides diferentes estão presentes na urina, alguns em altas concentrações. Os esteroides urinários analisados por cromatografia gasosa-espectrometria de massa identificam tipicamente mais de 30 de tais esteroides, e suas concentrações relativas podem ser usadas para localizar defeitos específicos na via esteroidogênica (Fig. 17.12).



(A) Cromatograma total de íons de um padrão de metabólitos urinários de esteroides obtido de um paciente com uma variante da deficiência de 21-hidroxilase, da hiperplasia adrenal congênita. Nessa condição, os metabólitos esteroides mais evidentes são o 17-hidroxipregnenolona, o pregnanotriol e o 11-oxopregnanotriol
(B) Padrão completo de íons produzidos da fragmentação do 11-oxopregnanotriol pelo detector da espectrometria de massa.
Eixo-x – m/z = massa da razão da carga.
Eixo-y – abundância relativa (quantidade de íons).

Fig. 17.12 Separação dos esteroides urinários realizada por espectrometria de massa. Este cromatograma de um teste clínico ilustra um padrão de metabólitos esteroidais urinários de um paciente com uma variante de deficiência da 21-hidroxilase de uma hiperplasia adrenal congênita. Nessa condição, os metabólitos esteroides mais evidentes são a 17-hidroxipregnenolona, o pregnanotriol e o 11-oxopregnanotriol. Eixo-x, tempo em minutos, no qual os metabólitos esteroides cromatograficamente separados são detectados pelo espectômetro de massa; eixo-y, abundância relativa (quantidade de Íons).

VITAMINA D3

A vitamina D_3 (colecalciferol) também é derivada do colesterol e tem um papel-chave no metabolismo do cálcio. A vitamina D e seus metabólitos são descritos no capítulo 25.

Resumo

- O colesterol é um constituinte vital das membranas celulares e a molécula precursora dos ácidos biliares, hormônios esteroides e vitamina D.

- O colesterol é derivado da dieta e também é sintetizado *de novo* a partir da acetil-CoA. A biossíntese do colesterol é finamente regulada. A enzima limitante de sua síntese é a HMG-CoA redutase.

- O metabolismo do colesterol em ácidos biliares e hormônios esteroides envolve várias reações de hidroxilação catalisadas pelas enzimas mono-oxigenases citocromo P-450.

- Várias doenças estão associadas com anormalidades na regulação da homeostasia do colesterol ou seu metabolismo.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Descreva a regulação da concentração intracelular do colesterol.

2. O que são os ácidos biliares secundários e como eles são produzidos?

3. Discuta a circulação êntero-hepática dos ácidos biliares.

4. Discuta o papel das mono-oxigenases na síntese dos esteroides.

Leituras sugeridas

Charlton-Menys V, Durrington PN. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol*. 2007;93:27-42.

Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signaling pathway mediated by the nuclear receptor LXRa. *Nature*. 1996;383:728-731.

Marcil M, Brooks-Wilson A, Clee SM, et al. Mutations in the *ABC1* gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *Lancet*. 1999;354:1341-1346.

Ory DS. Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis. *Circ Res*. 2004;95:660-670.

Sakai J, Rawson RB. The sterol regulatory element-binding protein pathway: control of lipid homeostasis through regulated intracellular transport. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12:261-266.

Vegiopoulos A, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;275:43-61.

Lipoproteínas e Transporte de Lipídios

M.H. Dominiczak

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a composição e as funções das lipoproteínas presentes no plasma: quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa, partículas remanescentes, lipoproteínas de baixa densidade e lipoproteínas de alta densidade.

- Descrever a via de transporte de combustível e a via do fluxo excedente do metabolismo de lipoproteína.

- Descrever o transporte reverso de colesterol e sua ligação com outras vias do metabolismo de lipoproteínas.

- Resumir os mecanismos e a regulação da concentração intracelular de colesterol, incluindo o papel dos fatores de transcrição relevantes, receptores e enzimas.

- Comentar os testes laboratoriais que avaliam o metabolismo dos lipídios e o risco cardiovascular.

- Discutir os principais componentes do processo de aterogênese: disfunção endotelial, deposição arterial de lipídios, inflamação crônica de baixo grau e suas relações com o crescimento e ruptura da placa aterosclerótica.

INTRODUÇÃO

O metabolismo da lipoproteína está intimamente ligado com o metabolismo de substratos para energia. Na saúde, as lipoproteínas transportam os triacilgliceróis (sinonimamente chamados de triglicerídeos: nós usamos ambos os termos) e o colesterol entre os órgãos e tecidos. As anormalidades no metabolismo das lipoproteínas são fatores-chave no desenvolvimento da aterosclerose, um processo que afeta as paredes arteriais e, consequentemente, o fornecimento de sangue e a oferta de oxigênio ao coração (causando doença cardíaca coronariana), cérebro (causando acidente vascular cerebral) e outras grandes artérias (causando doença vascular periférica). A doença cardiovascular relacionada com a aterosclerose é atualmente a causa de morte mais frequente no mundo industrializado.

Os ácidos graxos livres e os triacilgliceróis são transportados entre os órgãos e os tecidos

Os ácidos graxos são, juntos com a glicose, os principais compostos a partir dos quais o metabolismo gera energia (substratos energéticos). Importante, eles podem ser armazenados para fornecer energia durante os períodos de jejum. Eles são absorvidos a partir do intestino como componentes da dieta, mas também são sintetizados endogenamente, primariamente no fígado e no intestino. O seu principal local de armazenamento é o tecido adiposo, onde são armazenados como ésteres de glicerol, triacilgliceróis (Cap. 16). Os ácidos graxos precisam ser transportados de seus locais de absorção ou síntese para os tecidos periféricos. Os ácidos graxos livres (não esterificados) de cadeias pequenas e médias viajam no plasma ligado à albumina, mas os ácidos graxos de cadeias longas são muito hidrofóbicos para serem transportados desta maneira. Em vez disso, eles são transportados como triacilgliceróis reunidos em partículas conhecidas como lipoproteínas. Assim, as lipoproteínas formam uma rede de transporte que permite trocas de triacilgliceróis e colesterol entre órgãos e tecidos.

LIPOPROTEÍNAS

As lipoproteínas plasmáticas são partículas de diferentes tamanhos e densidade

Além de triacilgliceróis, as partículas de lipoproteínas contêm colesterol, fosfolipídios e proteínas (apolipoproteínas). Eles também transportam vitaminas lipossolúveis, tais como a vitamina A e a vitamina E. Uma partícula de lipoproteína contém um núcleo hidrofóbico de ésteres de colesterol e triacilgliceróis (Fig. 18.1). Fosfolipídios anfipáticos e colesterol livre, juntos com as apolipoproteínas, formam sua camada externa. Algumas proteínas, tais como as apolipoproteínas B (apoB), estão embebidas na superfície da partícula enquanto outras, tais como a apoC, são somente fracamente ligadas e podem ser facilmente trocadas.

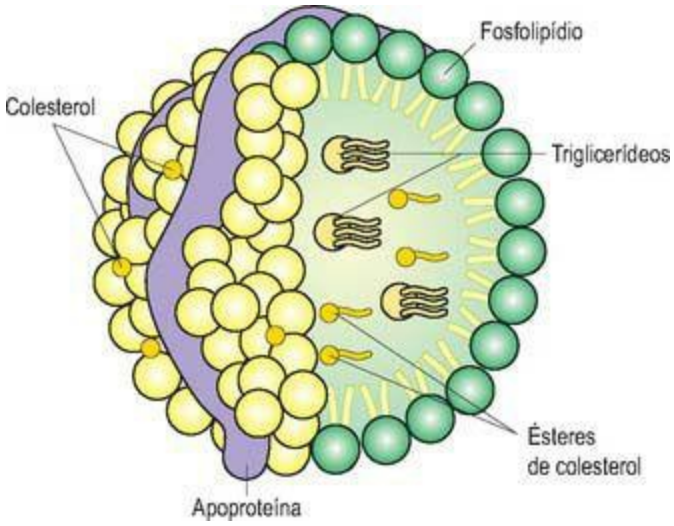


Fig. 18.1 Partícula de lipoproteína. A partícula de lipoproteína tem uma superfície externa hidrofílica e um interior hidrofóbico. A camada externa contém colesterol livre, fosfolipídios e apolipoproteínas. Os ésteres de colesterol e os triacilgliceróis se localizam no núcleo hidrofóbico da partícula.

As lipoproteínas presentes no plasma formam uma escala de tamanho e densidade (Tabela 18.1). Elas são classificadas com bases ou em suas densidades ou nas apolipoproteínas constituintes. As principais classes de lipoproteínas são os quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), partículas remanescentes (que incluem as lipoproteínas de densidade intermediária, IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL). As VLDL e as partículas remanescentes são ricas em triacilgliceróis, enquanto as LDL são pobres em triacilgliceróis e ricas em colesterol. A densidade das partículas aumenta e o tamanho diminui, com redução do conteúdo de triacilgliceróis de quilomícrons (os mais leves) passando pelas VLDL, IDL, LDL até HDL (a mais pesada). A HDL contém diferentes apolipoproteínas, colesterol e fosfolipídios, mas relativamente pouco triacilglicerol.

Tabela 18.1 Classes de lipoproteínas.

Partícula	Densidade (kg/L)	Principal componente	Apoproteínas*	Diâmetro (μm)
Quilomícrons	<0,95	TG	B48 (A, C, E)	75-1.200
VLDL	0,95-1,006	TG	B100 (A, C, E)	30-800
IDL	1,006-1,019	TG e colesterol	B100, E	25-35
LDL	1,019-1,063	Colesterol	B100	18-25
HDL	1,063-1,210	Proteína	AI, AII (C, E)	5-122

*TG, triacilglicerol (triglicerídeo); VLDL, lipoproteínas de densidade muito baixa; IDL, lipoproteínas de densidade intermediária; HDL, lipoproteínas de alta densidade. Quando separadas por eletroforese, as VLDL são chamadas de pré-β-lipoproteínas, LDL, β-lipoproteínas e HDL α-lipoproteínas. *Principais apoproteínas presentes em determinada partícula de lipoproteína são indicadas primeiro, com as trocadas com outras partículas, em parênteses.*

Apolipoproteínas

As apolipoproteínas, componentes proteicos das partículas de lipoproteína, têm um papel ativo em seu metabolismo. Também, durante a montagem da partícula, normalmente é uma apolipoproteína que forma um domínio para a adição de lipídios (lipidação).

As apolipoproteínas interagem com os receptores celulares

As apolipoproteínas que assentam na superfície das partículas de lipoproteínas determinam seu destino metabólico através de interações com receptores celulares. Elas também servem como ativadores e inibidores de enzimas participantes no metabolismo da lipoproteína. As principais apoproteínas estão listadas na Tabela 18.2. As mais importantes são a apoA, apoB, apoC, apoE e apo(a). Cada classe de lipoproteína contém um grupo característico de apoproteínas. As apoproteínas A (AI e AII) estão presentes na HDL. A variante da apoproteína B, chamada de apoB 100, controla o metabolismo do LDL, enquanto sua forma incompleta, a apoB48 (parte *N*-terminal contendo 48% da apoB100; Fig. 34.7) controla os quilomícrons.

Tabela 18.2 Funções das lipoproteínas.

Apoproteína	Função estrutural	Receptor	Efeito sobre atividade enzimática
AI	HDL	receptor *scavengerr*	ativador da LCAT
		B1 (SRB1)	
		receptor HDL	
AII	HDL	receptor HDL?	cofactor da LCAT
(a)	Lp(a)	receptor de plasminogênio?	provavelmente interfere com a fibrinólise
B48	quilomícrons	LRP	HTGL?
B100	VLDL, IDL, LDL	receptor de LDL	–
CI, CII	–	–	ativação de LPL
CIII	–	–	inibição de LPL
E	partículas remanescentes	receptor de LDL	–

Note que a apoE e a apoB se ligam ao mesmo receptor celular: o receptor apoB/E. LCAT, lecitina:colesterol aciltransferase; LRP, proteína relacionada com o receptor de LDL; HTGL, triglicerídeo lipase hepática; LPL, lipoproteína lipase.

AS LIPOPROTEÍNAS SÃO SEPARADAS POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO

Todo laboratório clínico usa centrífugas simples para separar as células vermelhas sanguíneas do soro ou plasma. Estas máquinas exercem força centrífuga moderada, 2.000-3.000 g. Entretanto, na

bioquímica especializada de lipídio, proteína e ácido nucleico, forças centrífugas muito maiores (40.000-100.000 g) são aplicadas ao plasma para separar partículas e moléculas. Esta técnica é chamada de ultracentrifugação e é extensivamente usada na pesquisa de lipídios. Quando a força centrífuga é aplicada à uma solução, as partículas que são mais pesadas do que o solvente sedimentam, e aquelas mais leves do que o solvente flutuam na superfície a uma razão proporcional à força centrífuga aplicada e ao tamanho da partícula. A fórmula a seguir mostra os fatores que afetam o movimento da partícula:

$$v = [d^2(P_p - P_s) - g]/18\mu$$

onde v = taxa de sedimentação, d = diâmetro, P_p = densidade da partícula, P_s = densidade do solvente, μ = viscosidade do solvente e g = força gravitacional.

Na técnica conhecida como separação por ultracentrifugação, o plasma é coberto com uma solução de densidade definida, por exemplo, 1,063 kg/L, a densidade da VLDL. Após várias horas de centrifugação (com a velocidade do rotor em torno de 40.000 rpm/min), a VLDL migra para a superfície, onde ela pode ser coletada. Outras soluções de densidade podem ser usadas para separar outras lipoproteínas. Modificações da técnica de ultracentrifugação, tais como centrifugação por gradiente de densidade, podem ser aplicadas para separar o plasma em várias bandas contendo diferentes frações de lipoproteínas.

A apoproteína E controla a ligação de partículas remanescentes ao receptor. As apoproteínas C agem como ativadores e inibidores de enzimas e são extensivamente trocadas entre as diferentes classes de lipoproteínas. A apolipoproteína (a) é um componente da lipoproteína (a) (Lp(a)) que pode ter função na fibrinólise.



EXISTEM SEMELHANÇAS ESTRUTURAIS ENTRE A LIPOPROTEÍNA(a) E O PLASMINOGÊNIO

A lipoproteína(a) é formada no fígado e tem uma mobilidade pré-β na eletroforese. Sua densidade atravessa a faixa desde a LDL à HDL (1,04-1,125 g/mL). Ela consiste em uma partícula de LDL contendo uma apoB100 ligada a outra apoproteína, apo(a), através de ponte dissulfeto. A apo(a) é uma glicoproteína caracterizada por um número considerável de variantes (isoformas) de diferentes tamanhos. A massa molecular dessas isoformas varia entre 200 e 800 kDa. A apo(a) possui um domínio protease e um número de sequências repetidas de aproximadamente 80-90 aminoácidos de extensão, estabilizada por pontes dissulfeto em uma estrutura de tripla hélice. Estas estruturas são chamadas de *kringles* (nome de pastel dinamarquês com forma similar). Um dos *kringles*, o *kringles* IV, é repetido 35 vezes na sequência da apo(a). O número de *kringles* IV repetidos determina o tamanho das isoformas da lipoproteína(a). Interessantemente, a apo(a) exibe uma homologia de sequência considerável com o plasminogênio, uma proteína envolvida na resolução do coágulo (fibrinólise; Cap. 6). Embora ela não possua atividade proteásica do plasminogênio, ela pode prejudicar a ação do plasminogênio.

RECEPTORES DE LIPOPROTEÍNA

O receptor de LDL é regulado pela concentração intracelular de colesterol

Os receptores de lipoproteínas presentes nas membranas celulares medeiam a captação dessas partículas e assim permitem às células adquirirem colesterol e outros lipídios. O principal receptor de lipoproteína é o receptor apoB/E, também conhecido como receptor de LDL. Ele foi descoberto por Joseph Goldstein e Michael Brown, que juntos receberam o prêmio Nobel em 1985 por este trabalho. O receptor pode ligar *ou apoB100 ou apoE*. A apoE se liga ao receptor com maior afinidade do que a apoB. A proteína do receptor maduro contém 839 aminoácidos e atravessa a membrana celular (Fig. 18.2). O gene do receptor está localizado no cromossoma 19, e sua expressão é regulada pela concentração intracelular de colesterol. Importante, a forma truncada do apoB, a apoB48, presente nos quilomícrons, não pode se ligar ao receptor apoB/E; entretanto, os quilomícrons remanescentes possuem apoE que pode se ligar ao receptor apoB/E e a outro receptor chamado de proteína relacionada ao receptor de LDL (LRP).

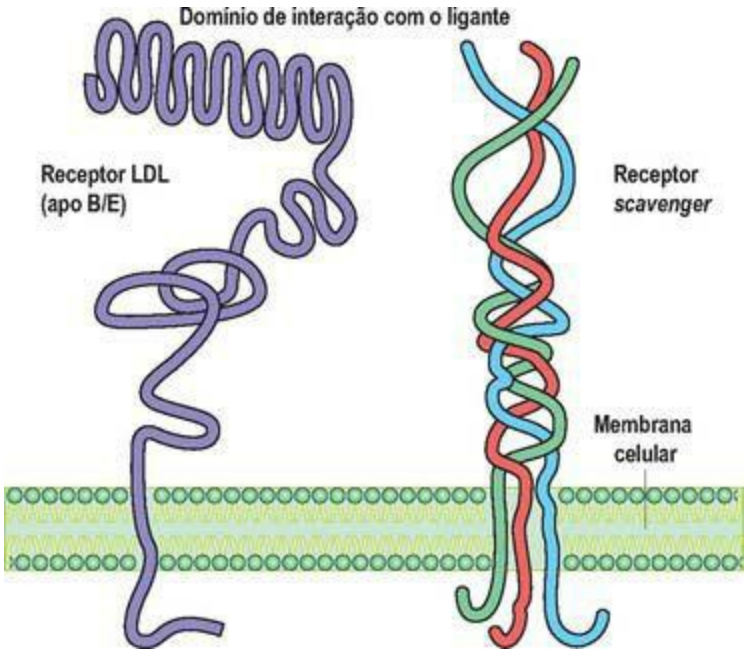


Fig. 18.2 Receptores de lipoproteína. O receptor apoB/E, também conhecido como receptor de LDL, medeia a captação celular de partículas intactas de LDL. O receptor *scavenger* internaliza a LDL quimicamente modificada (p. ex., oxidada). Ambos os tipos do receptor atravessam as membranas celulares. A expressão do receptor de LDL é regulada pela concentração intracelular de colesterol, enquanto o receptor *scavenger* permanece não regulado. O receptor *scavenger* tipo A, ilustrado aqui, está presente em macrófagos e tem uma estrutura tipo colágeno. O receptor *scavenger* tipo B1 participa no metabolismo da HDL (compare com a Figura 26.5).

Os receptores scavenger são inespecíficos e não são regulados

Enquanto o receptor apoB/E tem ligantes bem definidos, os receptores *scavenger* são receptores de membrana que podem ligar diferentes moléculas. Eles estão presentes nas células fagocíticas, tais como os macrófagos. Eles também diferem do receptor de LDL por não serem submetidos à regulação por retroalimentação e, portanto, eles podem sobrecarregar a célula com qualquer molécula que eles liguem. Os receptores *scavenger* são designados como classe A, classe B e CD36. Os receptores classe A têm uma estrutura em tripla hélice tipo colágeno. Eles não ligam a LDL intacta, mas se ligam facilmente à LDL modificada quimicamente (p. ex., oxidada) (Fig. 37.5). O receptor classe B liga partículas de HDL no fígado.

ENZIMAS E ENZIMAS DE TRANSFERÊNCIA QUE PARTICIPAM NO METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNA

Duas hidrolases, a lipoproteína lipase (LPL) e a triglicerídeo lipase hepática (HTGL), removem triacilgliceróis das partículas de lipoproteína. A LPL encontra-se ligada a proteoglicanos de heparan sulfato na superfície das células endoteliais vasculares, e a HTGL encontra-se associada às membranas plasmáticas no fígado. A LPL digere os triacilgliceróis nos quilomícrons e VLDL, e libera os ácidos graxos e glicerol para as células. A HTGL age sobre as partículas parcialmente digeridas pela LPL e facilita a conversão de IDL em LDL (ver adiante).

A lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT) é uma enzima glicoproteica sintetizada no fígado, a qual está associada à HDL. A LCAT esterifica o colesterol adquirido das células pela HDL. A LCAT é ativada pela apoAI. Note que dentro das células o colesterol é esterificado por uma enzima diferente – acilCoA:acilcolesterol transferase (ACAT). Existem duas isoformas da ACAT: ACAT1 é a isoforma primária em macrófagos, e a ACAT2 está presente no intestino e no fígado. Outra proteína, a proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), facilita a troca de ésteres de colesterol por triacilgliceróis entre HDL e VLDL e IDL.

VIAS DO METABOLISMO DA LIPOPROTEÍNA

Os principais estágios do metabolismo da lipoproteína são os seguintes:

- Formação das partículas de lipoproteína. Os quilomícrons são formados no intestino, e o VLDL no fígado.

- Transferência de ácidos graxos das lipoproteínas para as células. Isto é facilitado pela LPL e pela HTGL e transforma os quilomícrons e a VLDL em partículas remanescentes.

- Ligação das partículas remanescentes aos receptores e sua captação pelas células.

- Transformação de alguns remanescentes em LDL, sua subsequente ligação ao receptor B/E e captação.

- Transporte reverso de colesterol, isto é, remoção do colesterol das células pelas partículas de HDL.

A via envolvendo a formação de quilomícrons (após uma refeição) ou a formação da VLDL (no estado de jejum), suas transferências para os tecidos periféricos, suas hidrólises pela lipoproteína lipase e a captação celular dos remanescentes estão intimamente relacionados ao ciclo de alimentação-jejum (Cap. 21) e, através dele, ao metabolismo energético. Devido ao processo-chave aqui ser o transporte de triacilgliceróis, nós o chamaremos de *via de transporte de combustível* (Fig. 18.3). A via do transporte de combustível está intimamente ligada ao transporte reverso de colesterol através da troca de componentes das lipoproteínas. Ela gera LDL como um produto da distribuição dos substratos energéticos. Chamaremos o metabolismo da LDL, desde o estágio de hidrólise das partículas remanescentes pela HTGL à captação da LDL pelas células, como *via do fluxo excedente*.

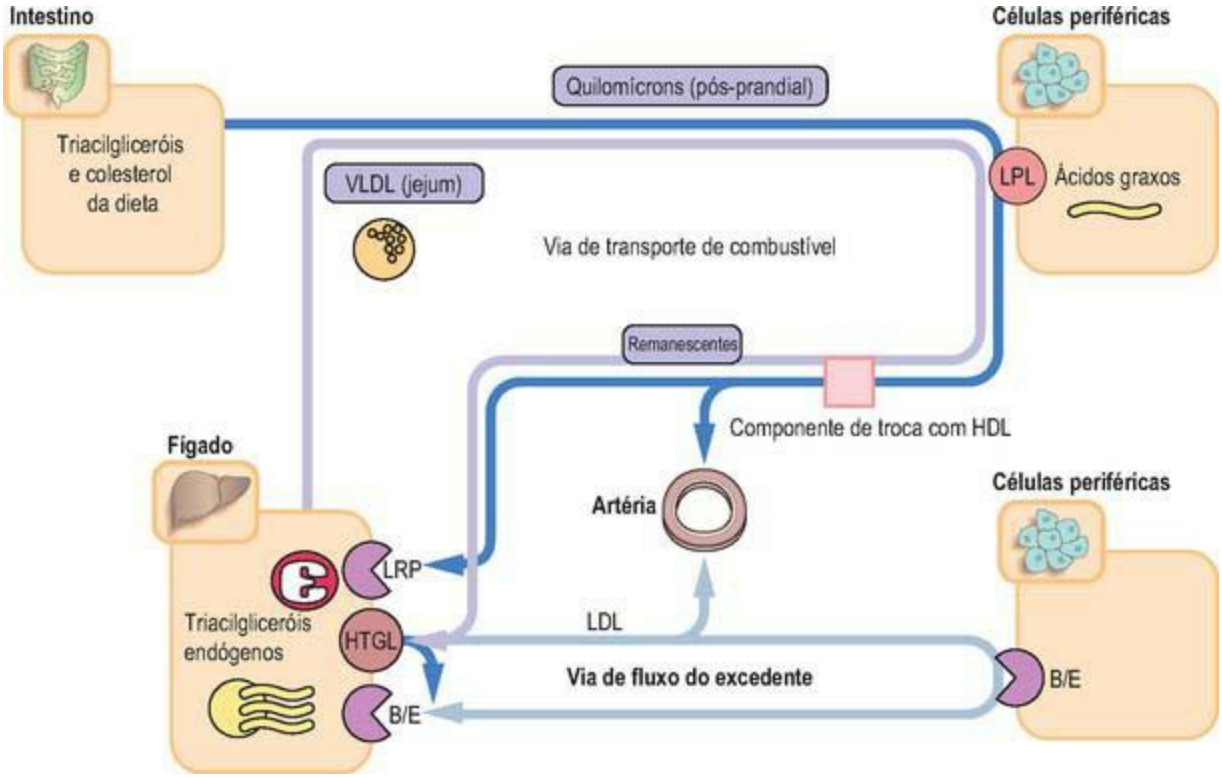


Fig. 18.3 Metabolismo da lipoproteína: a via de transporte de combustível e a via do fluxo excedente. *A via de transporte de combustível* está ligada ao metabolismo energético e ao ciclo alimentação jejum. No estado alimentado, os quilomícrons transportam os triacilgliceróis (triglicerídeos) para a periferia, onde a lipoproteína lipase hidrolisa os triglicerídeos, liberando ácidos graxos para as células. Os quilomícrons remanescentes são metabolizados no fígado. No estado de jejum, a VLDL transporta combustível do fígado para os tecidos periféricos. Seus remanescentes também retornam ao fígado através do receptor B/E. Os quilomícrons remanescentes também são captados pelas LRP. As partículas remanescentes adquirem ésteres de colesterol adicionais da HDL em troca por triglicerídeos. As remanescentes possuem vida curta e são aterogênicas. Na prática clínica, o melhor indicador da atividade da via de transporte de combustível é a medida de triglicerídeos do plasma. *A via do fluxo excedente* é a via do metabolismo da LDL. As LDL são geradas a partir dos remanescentes da via de transporte de combustível, são ricas em colesterol e aterogênicas. Seu tempo de vida na circulação é maior do que o das remanescentes. Elas são captadas pelo receptor apoB/E em resposta à diminuição da concentração intracelular de colesterol. Na prática clínica, os indicadores da atividade da via do fluxo excedente são as medidas do colesterol total e do LDL-colesterol plasmático. LPL, lipoproteína lipase; LRP, proteína relacionada ao receptor de LDL.

A via de transporte de combustível do metabolismo de lipoproteína

Os quilomícrons transportam os lipídios da dieta

Os triacilgliceróis presentes nos alimentos são quebrados pelas lipases pancreáticas e são absorvidos como monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol livre (Cap. 10). As células intestinais (enterócitos) ressintetizam os triacilgliceróis e, junto com os fosfolipídios, colesterol e apoB48, se organizam formando os quilomícrons. Estes são secretados na linfa e alcançam o plasma através do ducto torácico.

A principal apoproteína é a apoB48. Os quilomícrons também contêm as apoproteínas A, C e E. Uma vez que os quilomícrons alcançam os tecidos periféricos, seus triacilgliceróis são hidrolisados pela LDL e os ácidos graxos entram nas células. O que resta dos quilomícrons são pequenas partículas chamadas de quilomícrons remanescentes. Os remanescentes adquirem alguns ésteres de colesterol da HDL (ver adiante). A alteração no tamanho da partícula expõe a apoE que medeia a ligação do remanescente ao receptor apoB/E e ao LRP no fígado. A meia-vida dos quilomícrons no plasma é menor do que 1 h. Normalmente os quilomícrons aparecem no plasma somente após refeições contendo gordura, dando ao plasma uma aparência leitosa (Fig. 18.3).

As partículas de VLDL transportam os triacilgliceróis sintetizados no fígado

Os triacilgliceróis sintetizados no fígado são transportados pela VLDL. Eles são reunidos no fígado às moléculas de apoB100. A lipidação da apoB é facilitada pela proteína microssomal de transferência de triglicerídeo (MTP). A apoB100 não utilizada é degradada pela protease dependente de ubiquitina (Cap. 33, Fig. 33.10). Após ser secretada no plasma, a VLDL adquire ésteres de colesterol e apoproteínas (apoC e apoE) da HDL. Nos tecidos periféricos, seus triacilgliceróis são hidrolisados pela LPL de uma maneira análoga aos quilomícrons: isto gera VLDL remanescente também chamado de IDL. Na VLDL, as conformações da apoB100 e da apoE não permitem ligação ao receptor apoB/E. Entretanto, nas partículas remanescentes, a apoE assume uma conformação que permite tal ligação. Assim, as remanescentes ou são captadas pelo fígado ou são posteriormente hidrolisadas por outra enzima, a triglicerídeo lipase hepática, e transformadas em LDL.

Por causa da perda de triglicerídeos, as partículas remanescentes são agora relativamente ricas em colesterol. Além disso, seu pequeno tamanho facilita a penetração na camada endotelial, o que a torna aterogênica.

As partículas de LDL são captadas pelas células pela mesma via das partículas remanescentes

A LDL é uma pequena lipoproteína gerada a partir dos remanescentes pela triglicerídeo lipase hepática. As LDL são ricas em colesterol e contêm somente uma apolipoproteína: a apoB100. Elas representam o principal carreador de colesterol no plasma. Elas permanecem na circulação muito mais tempo do que as remanescentes e são captadas através do receptor apoB/E (embora elas tenham afinidade mais baixa pelo receptor do que as remanescentes contendo apoE) ou pelo fígado (aproximadamente 80% das partículas) ou pelas células periféricas (Fig. 18.3).

A síntese de colesterol intracelular e sua captação são interdependentes

A maioria das células sintetiza seu próprio colesterol. Entretanto, quando a concentração do colesterol intracelular diminui, as células podem adquirí-lo do meio externo – e as lipoproteínas constituem um local de armazenamento de colesterol extracelular sobre o qual as células exercem ação. Após internalização, o complexo LDL-receptor é digerido por enzimas lisossomais e o colesterol liberado é esterificado na célula. A proteína do receptor é reciclada de volta à membrana. O colesterol livre liberado dentro da célula é um regulador de retroalimentação de sua própria síntese. Isto é mediado por uma família de fatores de transcrição chamados de proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBPs). Os SREBPs regulam a transcrição de genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese do colesterol: 3-hidroxi-3metilglutaril coenzima. A sintase e HMG-CoA redutase e também o gene que codifica para o receptor apoB/E (Cap. 17). A depleção dos esteróis hepáticos aumenta o nível da SREBP e, consequentemente, a síntese de colesterol e a expressão do receptor apoB/E. Por outro lado, a concentração intracelular aumentada de colesterol inibe a via da SREBP, reduzindo a síntese de colesterol e a expressão do receptor (Figs. 18.4 e 17.7).

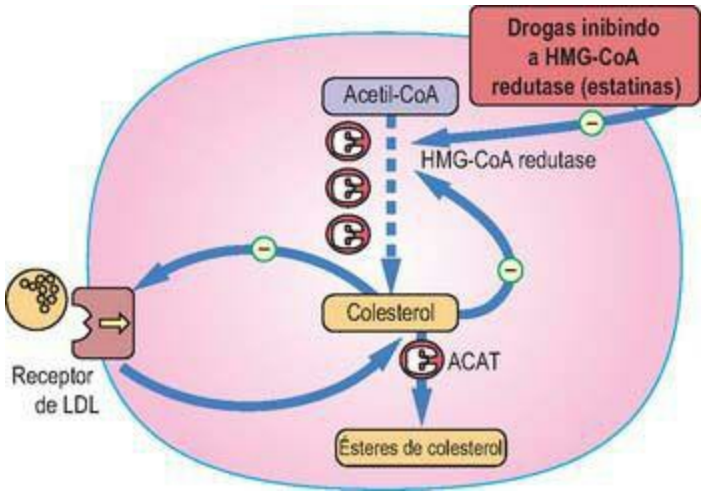


Fig. 18.4 Regulação da concentração intracelular de colesterol. O colesterol intracelular regula a atividade da HMG-CoA redutase, a enzima limitante da síntese do colesterol, e também a expressão dos receptores de LDL na membrana celular. A expressão do gene relevante é controlada pelo fator de transcrição SREBP (Fig. 17.7). ACAT, acil-CoA:acilcolesterol transferase; SREBP, proteína ligante do elemento regulador de esterol.

Via do transporte reverso de colesterol

O colesterol é removido das células para o HDL por moléculas transportadoras específicas

A função das partículas de HDL é transportar o colesterol na direção reversa: dos tecidos periféricos para o fígado (Fig. 18.5). As HDL são sintetizadas no intestino e fígado. Suas apolipoproteínas principais são a apoAI e a apoAII, mas elas também contêm apoC e apoE. Importante, as HDL são capazes de trocar as apoproteínas, fosfolipídios, triacilglicerol e ésteres de colesterol com quilomícrons, VLDL e remanescentes.

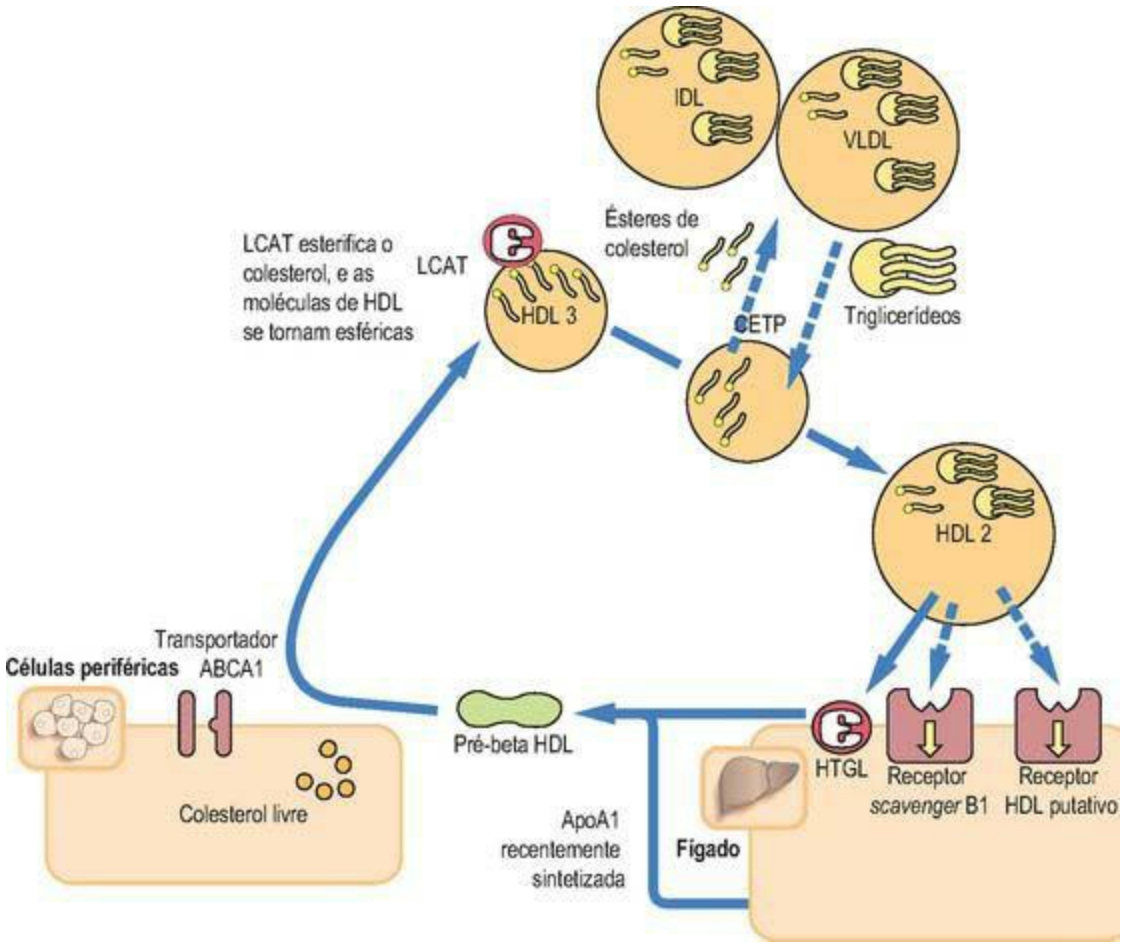


Fig. 18.5 Transporte reverso de colesterol. A HDL é formada no fígado e no intestino como partículas discoides. Elas adquirem o colesterol a partir das membranas celulares através do transportador ABCA1. A LCAT associada com a HDL esterifica o colesterol adquirido. Os ésteres de colesterol se movem para dentro da partícula, tornando-a esférica. A proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) facilita a troca de apoproteínas e ésteres de colesterol entre a HDL e as lipoproteínas ricas em triacilglicerol; a HDL adquire triacilgliceróis em troca dos ésteres de colesterol. Isto aumenta mais o seu tamanho. Finalmente, a HDL transfere seus ésteres de colesterol para o fígado após se ligar ao receptor *scavanger* B1 na membrana do hepatócito. Quando acaba a transferência do colesterol, o tamanho da partícula de HDL diminui novamente; uma parte do material redundante é usada para formar partículas ricas em apoA1 e pobres em lipídios (pré-βHDL), que retornam ao ciclo de remoção de colesterol. HTGL, triglicerídeo lipase hepática; LCAT, lecitina:colesterol aciltransferase.

As HDL são formadas como partículas discoides, pobres em lipídios (pré-β HDL) que contêm principalmente apoAI; elas são parcialmente construídas a partir do excesso de fosfolipídio perdido da VLDL durante sua hidrólise pela LPL. Estas HDL nascentes retiram o colesterol das células através da ação de uma proteína de membrana conhecida como transportador A1 cassete ligante de

ATP (ABCA1; Cap. 8). O ABCA1 usa ATP como fonte de energia e é o controlador limitante da taxa de efluxo do colesterol livre para apoAI. Outro transportador cassete ligante de ATP, ABCG1, transfere colesterol das células para partículas de HDL maduras. Outros, conhecidos como ABCG5 e ABCG8, residem nas membranas apicais dos hepatócitos onde eles controlam o movimento do colesterol para a bile. Os genes ABCA1 e ABCG1 são regulados pelo receptor X do fígado (Cap. 17).

O TRANSPORTADOR ABCA1 E A DOENÇA DE TANGIER

O papel do transportador ABCA1 na remoção do colesterol das células foi definido como um resultado do estudo de uma dislipidemia muito rara conhecida como doença de Tangier. Os pacientes que sofrem da doença de Tangier não têm quase nenhuma HDL e mostram deposição de ésteres de colesteril nos tecidos, tais como as amígdalas (que adquirem uma cor laranja característica), baço, mucosa intestinal e córnea. Os pacientes com a doença de Tangier sofrem de doença coronariana mais frequentemente do que aqueles sem a doença. A causa da doença é uma mutação no gene que codifica o transportador ABCA1.

OS RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADOR DE PEROXISSOMA (PPARs) CONTROLAM O METABOLISMO DE CARBOIDRATO E LIPÍDIO

Os PPARs são fatores de transcrição ativados por lipídios que regulam genes que controlam a homeostasia de carboidratos e lipídios. Os PPARs formam dímeros com o receptor retinoide X, RXR, e o dímero se liga subsequentemente aos seus elementos de resposta nos genes promotores. Um dos PPARs, o PPAα, regula a expressão do grupo de gene AI-CIII-AIV. Ele aumenta a expressão de apoAI e apoAII e reduz a expressão do gene apoCIII. Ele também aumenta a expressão da LPL. Os PPARs são importantes alvos da ação de fármacos. Os fármacos redutores de lipídios mais comumente usados, derivados do ácido fíbrico (fibratos), ativam o PPARα (Cap. 21).

Após a HDL nascente adquirir o colesterol livre, ele é esterificado pela LCAT, e seus ésteres de colesterol se movem para o interior da partícula de HDL. A partícula, agora conhecida como HDL-3, se expande, assumindo um formato esférico. Auxiliada pela proteína de transferência de éster de colesterol, ela transfere alguns ésteres de colesterol para as lipoproteínas ricas em triglicerídeos (incluindo VLDL e quilomícrons remanescentes) em troca por triglicerídeos; isto permite aos ésteres de colesterol retornarem à via VLDL-IDL-LDL. A aquisição dos triglicerídeos as torna ainda maiores; sendo agora chamada de HDL-2. A HDL-2 se liga aos receptores *scavenger* classe B no fígado e transfere colesterol para a membrana celular. A partícula não é captada pelas células, mas encolhe novamente e suas partes redundantes se tornam HDL nascentes que participam no próximo ciclo de transporte.

Além de sua participação no transporte reverso de colesterol, a HDL tem outras propriedades ateroprotetoras. Por exemplo, elas ativam a óxido nítrico sintase endotelial, eNOS, promovendo a produção de NO. Elas também têm propriedades anti-inflamatórias.

DISLIPIDEMIAS

Defeitos no metabolismo das lipoproteínas levam a desordens conhecidas como hiperlipidemias ou dislipidemias. Sua classificação original, agora atualizada, foi baseada no comportamento eletroforético das lipoproteínas (Tabela 18.3). Atualmente usa-se a classificação genética (Tabela 18.4). Uma revisão das anormalidades do metabolismo das lipoproteínas é mostrada na Figura 18.6.

Tabela 18.3 Classificação fenotípica das dislipidemias. Na eletro-forese, as α-lipoproteínas (HDL) são as que migram mais rápido, na frente, em direção ao catodo (eletrodo +), seguidas pelas pré-β-ipoproteínas (VLDL) e β-lipoproteínas (LDL). Os quilomícrons permanecem na extremidade do anodo, na origem da fita eletroforética.

Tipo de dislipidemia (Fredrickson)	Fração eletroforética aumentada (lipoproteínas)	Colesterol aumentado	Triglicerídeo aumentado
I	quilomícrons	sim	sim
IIa	β (LDL)	sim	não
IIb	pré-β e β (VLDL, LDL)	sim	sim
III	"banda larga" β (IDL)	sim	sim
IV	pré-β (VLDL)	não	sim
V	pré-β (VLDL) mais quilomícrons	sim	sim

Esta é uma classificação desenvolvida por Donald Fredrickson e adaptada pela WHO; se baseia na separação eletroforética das lipoproteínas séricas. Ela tem sido largamente substituída pela classificação genética ou simplesmente descrita de acordo com os níveis plasmáticos de colesterol, triacilglicerol e HDL-colesterol, como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia ou dislipidemia mista.

Tabela 18.4 As dislipidemias genéticas mais importantes. As três dislipidemias clinicamente mais importantes são a hipercolesterolemia familiar, a hiperlipidemia combinada familiar e disbetalipoproteinemia familiar.

Dislipidemia	Frequência/herança	Defeito	Padrão lipídico plasmático	Risco cardiovascular aumentado
Hipercolesterolemia familiar	1:500 autossômico dominante	deficiência no receptor de LDL ou prejuízo funcional	hipercolesterolemia ou hiperlipidemia mista (IIa ou IIb)	sim
Hiperlipidemia combinada familiar	1:50 autossômico dominante	superprodução de apoB100	hipercolesterolemia ou hiperlipidemia mista (IIa ou IIb)	sim
Disbetalipoproteinemia familiar (hiperlipidemia tipo III)	1:5.000 autossômico recessivo	presença de isoforma E2/E2. ligação defeituosa de remanescentes ao receptor de LDL	hiperlipidemia mista (III)	sim

Hiperlipidemia mista = colesterol e triglicerídeos plasmáticos aumentados

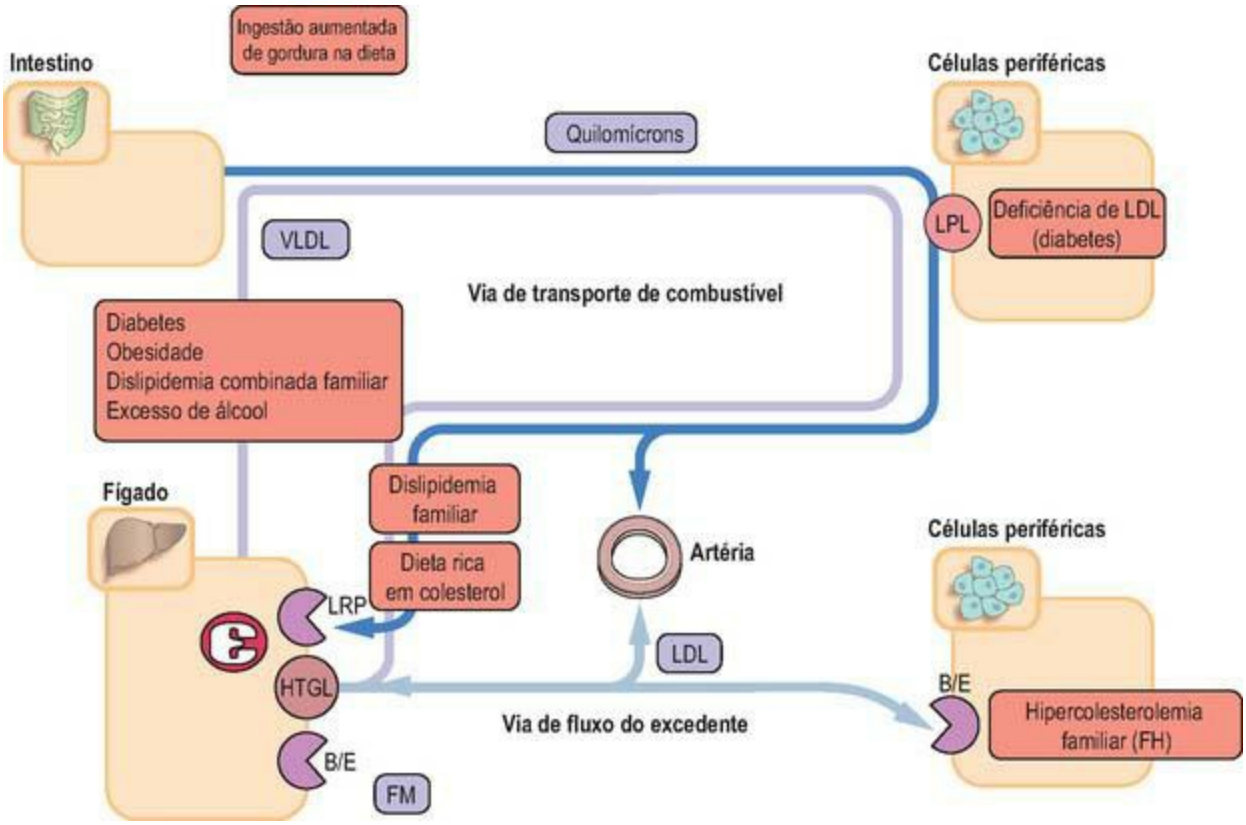


Fig. 18.6 Visão geral das anormalidades do metabolismo de lipoproteína. Compare com a Figura 18.3. *Condições que afetam primariamente a via de transporte de combustível:* a via de transporte de combustível é afetada por condições comuns, tais como ingestão excessiva na dieta, obesidade e diabetes. A rara deficiência de LPL causa extrema elevação dos quilomícrons e da VLDL. Importante, nesta via as concentrações de lipoproteína mudam com o ciclo alimentação jejum. As concentrações dos remanescentes aterogênicos aumentam pós-prandialmente e podem ser importantes na aterogênese. A disbetalipoproteinemia familiar afeta a captação de remanescente devido à mutação na apoE. *Condições que afetam primariamente a via do fluxo excedente*: o defeito mais importante da via do fluxo excedente é a captação prejudicada de LDL devido a mutações no gene do receptor apoB/E. A hipercolesterolemia familiar afeta primariamente a via do fluxo excedente, aumentando a LDL, mas a captação de remanescente também se encontra prejudicada. *Condições que afetam ambas as vias:* a hiperlipidemia combinada familiar afeta ambas as vias por causa da síntese aumentada de VLDL e consequente maior taxa de geração de LDL. Similarmente, a dieta rica em gordura afeta ambas as vias. B/E, receptor apoB/E; HTGL, triglicerídeo lipase hepática; LPL, lipoproteína lipase; LRP, proteína relacionada ao receptor de LDL.

Anormalidades da via de transporte de combustível

A via de transporte de combustível do metabolismo lipídico é afetada pelas condições metabólicas comuns. O fluxo aumentado através da via de transporte de combustível ocorre mais comumente devido à síntese aumentada de VLDL. Isto ocorre em duas condições muito comuns, obesidade e diabetes. As dislipidemias diabéticas afetam ambas as vias de transporte de combustível e de transporte reverso de colesterol; padrões comuns de lipoproteínas incluem um aumento na concentração plasmática de triacilglicerol combinado com uma diminuição no HDL-colesterol. Os pacientes diabéticos frequentemente têm LDL-colesterol normal, porque a via do fluxo excedente permanece relativamente não afetada; entretanto, é possível que a LDL diabética seja mais aterogênica do que as partículas não diabéticas, por causa das mudanças em seu tamanho e densidade (na diabetes, as LDL são menores e mais densas). Importante, a perda de peso reduz a atividade desta via. Outra condição comum que causa aumento na produção de VLDL é o abuso de álcool. Entretanto, em contraste ao diabetes, enquanto aumenta a VLDL, o excesso de álcool também aumenta a concentração de HDL.

A via de transporte de combustível também pode se tornar sobrecarregada se a hidrólise dos quilomícrons ou da VLDL for ineficiente. Isto também pode ocorrer na diabetes porque a falta de insulina inibe a lipoproteína lipase. Uma condição muito rara, a deficiência da lipoproteína lipase, resulta em concentrações extremamente altas de triglicerídeos plasmáticos.

A carga da lipoproteína na via de transporte de combustível está relacionada com a ingestão de alimentos e com o ciclo de alimentação jejum. Tem sido crescentemente reconhecido que um aumento nas lipoproteínas remanescentes aterogênicas, estimulado pela refeição, contribui para a aterogênese. De fato, pesquisadores sugeriram recentemente que a medida da concentração de triacilglicerol após uma refeição está mais intimamente ligada ao risco de doença cardiovascular do que a medida no jejum.

Finalmente, a condição rara, mas importante, que afeta a última etapa da via de transporte de combustível, a captação de remanescentes, é uma condição herdada conhecida como dislipidemia familiar. Ela é causada pela mutação da apoE que diminui sua ligação ao receptor apoB/E. A disbetalipoproteinemia familiar está associada com alta concentração plasmática de remanescente e doença cardiovascular prematura.

Anormalidades na via do fluxo excedente

Anormalidades da via do fluxo excedente levam a hipercolesterolemias que incluem a hipercolesterolemia familiar. O defeito mais importante do metabolismo da LDL é sua captação celular defeituosa. As anormalidades da via do fluxo excedente causadas por mutações no receptor apoB/E constituem a dislipidemia clássica observada em pacientes com hipercolesterolemia familiar (FH). Pacientes com FH têm uma alta concentração de LDL devido à captação celular defeituosa. O aumento na LDL também pode ser secundário à síntese aumentada de VLDL se existir uma transformação aumentada dos remanescentes em LDL. Isto ocorre em dislipidemia combinada familiar. Finalmente, a ingestão na dieta de gorduras saturadas também afeta a concentração de LDL. Uma dieta pobre em gordura pode reduzir o LDL e a concentração plasmática de colesterol em 10-15%.

ATEROGÊNESE

A aterosclerose é um processo que leva ao estreitamento ou completa oclusão da luz arterial. Clinicamente, isto pode causar infarto do miocárdio (se o bloqueio é em uma artéria coronária que irriga o coração), acidente vascular cerebral (bloqueio de uma artéria que irriga o cérebro) ou doença vascular periférica (estreitamento das artérias da perna causa dor característica ao caminhar, conhecida como claudicação intermitente). A aterogênese é o processo de desenvolvimento das placas ateroscleróticas.

O revestimento endotelial das paredes arteriais repele as células e inibe a coagulação do sangue

A luz de uma artéria saudável é revestida por uma camada confluente de células endoteliais. A superfície endotelial normal repele células circulantes no plasma e é fortemente antitrombótica. A parede arterial por si só consiste de três camadas: a camada subendotelial (a íntima), a camada média (a média), contendo células musculares lisas vasculares (VSMC) e a camada externa (a adventícia), composta por tecido conjuntivo frouxo e contendo nervos relevantes. As substâncias podem penetrar no endotélio ou através das junções entre as células endoteliais ou passando através das células.

O endotélio controla a vasodilatação pela secreção do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), que é o gás óxido nítrico

Uma importante função controlada pelo endotélio é a habilidade dos vasos sanguíneos de dilatar (vasodilatação) e contrair (vasoconstrição), e portanto regular o fluxo sanguíneo de tecidos e órgãos. A substância vasodilatadora mais importante é o óxido nítrico, sintetizado a partir da L-arginina pela NO sintase endotelial (eNOS). A atividade da eNOS é controlada pela concentração intracelular de cálcio. Existem duas isoenzimas da NOS: eNOS, que é constitutivamente expressa no endotélio e a indutível (iNOS), encontrada nas VSMC e em macrófagos. O óxido nítrico sinaliza via guanilato ciclase e GMP cíclico (Cap. 37). A diminuição na produção de NO contribui para o desenvolvimento de hipertensão. A droga usada em cardiologia, trinitrato de glicerina, para aliviar a dor no peito causada por oferta inadequada de oxigênio ao músculo cardíaco (*angina pectoris*), dilata as artérias coronárias por estimular a liberação de NO.

Os principais componentes da aterogênese são a disfunção endotelial, a deposição de lipídios e a reação inflamatória na parede vascular

A disfunção endotelial, a deposição de lipídio na íntima e a reação inflamatória que os acompanha resultam em mudança na estrutura de toda a parede arterial (remodelamento) e na formação de placas ateroscleróticas. Em todos os passos do processo, existe uma ligação entre as células endoteliais, as VSMC e as células inflamatórias derivadas do plasma (macrófagos e linfócitos). Isto envolve uma série de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento (Cap. 43), que atraem células para as lesões ateroscleróticas, induzem migração celular, proliferação, apoptose e produção excessiva de matriz extracelular (Fig. 26.9).

DISLIPIDEMIAS GENETICAMENTE DETERMINADAS

No Ocidente, aproximadamente 30% das pessoas têm concentração alta de colesterol no plasma.

A dislipidemia mais frequente (hipercolesterolemia comum) é poligênica e é um resultado de fatores genéticos e ambientais combinados. Assim, existem desordens mais raras com uma estrutura genética definida. As mais importantes são mencionadas adiante.

A **hipercolesterolemia familiar** é uma desordem monogênica causada por uma mutação no gene que codifica para o receptor apoB/E e ela afeta a via do fluxo excedente. A captação celular das partículas remanescentes e LDL ou está prejudicada (FH heterozigótica) ou completamente inibida (FH homozigótica, muito rara). Outras mutações inibem a reciclagem do receptor de LDL para a membrana plasmática. Os pacientes com hipercolesterolemia familiar têm concentrações muito altas de colesterol plasmático e de LDL-colesterol. O modo de herança é o autossômico dominante, de modo que, geralmente, existe uma história familiar proeminente de doença cardíaca precoce. Alguns pacientes desenvolvem depósitos de lipídio na mão e tendões do joelho e particularmente nos tendões de Aquiles; estes são conhecidos como xantomas e representam um diagnóstico para a doença. A hipercolesterolemia familiar carrega um alto risco de doença cardiovascular precoce (note: infarto prematuro é definido como uma ocorrência em homem com idade abaixo de 55 anos ou mulher abaixo de 65 anos).

Uma mutação no gene que codifica a proteína 6 relacionada ao receptor de LDL (diferente da FH) também tem sido relacionada com a doença cardíaca coronariana prematura, mostrando herança autossômica dominante.

A **hiperlipidemia combinada familiar** é caracterizada mais por uma superprodução de apoB100 do que por prejuízo na depuração mediada pelo receptor. Existe uma produção aumentada de VLDL e, consequentemente, geração aumentada de LDL; tanto o transporte de combustível como a via do fluxo excedente são afetados. Esta dislipidemia se apresenta com padrões lipídicos plasmáticos variáveis (ou hipercolesterolemia sozinha ou hipercolesterolemia com hipertrigliceridemia). A hiperlipidemia combinada familiar é uma causa relativamente comum de infartos do miocárdio prematuros.

A **disbetalipoproteinemia familiar afeta** primariamente a via de transporte de combustível e é causada por uma mutação no gene apoE, produzindo uma isoforma de apoE com baixa afinidade pelo receptor apoB/E. Nesta condição, os remanescentes se acumulam e existe um aumento em ambas as concentrações de colesterol e triglicerídeos no plasma. Os xantomas característicos estão presentes (xantoma palmar). Disbetalipoproteinemia familiar está associada com doença coronária precoce.

A **deficiência na lipoproteína lipase** é uma dislipidemia muito rara que afeta a via de transporte de combustível e é causada por uma deficiência da LPL. O acúmulo de quilomícrons e VLDL leva a concentrações muito altas de triglicerídeos. Os sinais clínicos incluem xantoma de pele do tipo erupção característicos. O risco associado com a deficiência de LPL é primariamente o de inflamação pancreática (pancreatite; Cap. 10) causada por concentrações muito altas de triglicerídeos.

Abetalipoproteinemia. Mutações no gene que codifica para a apoB também pode levar a VLDL baixa e consequentemente baixas concentrações de LDL. Uma dislipidemia muito rara conhecida como abetalipoproteinemia está associada com mutação do gene que codifica a proteína de transferência microssomal (MTP), envolvida na montagem celular da VLDL. Ver também Tabela 18.4.

MUTAÇÃO NO GENE DA APOPROTEÍNA CAUSA DISLIPIDEMIA ENVOLVENDO AS PARTÍCULAS REMANESCENTES

A apoproteína E tem um papel chave no metabolismo das lipoproteínas remanescentes. Sua síntese é controlada por três alelos principais, e2, e3 e e4. Ela é uma proteína relativamente pequena, com massa molecular de 34 kDa. Existem três isoformas principais: E2, E3 e E4. A apoE é reconhecida por ambos os receptores de LDL (apoB/E) e pelo LRP. A isoforma E2 tem afinidade muito mais baixa (1%) pelo receptor do que as outras isoformas. Isto, em homozigotos, reduz a captação dos remanescentes e resulta em dislipidemia familiar (formalmente conhecida como hiperlipidemia tipo III). A apoE também parece ser importante para o metabolismo de lipídio no sistema nervoso, onde ela é sintetizada pelos astrócitos do cérebro. A presença de um alelo e4 está associada com a doença de Alzheimer, uma desordem responsável por pelo menos 50% de todos os casos de demência.

DISLIPIDEMIA É COMUM NO *DIABETES MELLITUS*

Sr. B tem 67 anos de idade e tem diabetes tipo 2 e hipertensão branda. Quando ele visitou o ambulatório clínico, sua concentração de colesterol era de 6,9 mmol/L (265 mg/dL), os triglicerídeos 1,9 mmol/L (173 mg/dL) e o HDL-colesterol 0,9 mmol/L (35 mg/dL). A glicose sanguínea de jejum era 8,5 mmol/L (153 mg/dL) e a hemoglobina glicosilada (HbA_{1C}) 5,0%. Ele foi tratado com dieta e um derivado de sulfonilureia, que potencializou a liberação de insulina estimulada pela glicose e reduziu a concentração sanguínea de glicose.

Comentário. A diabetes acarreta um risco 2-3 vezes maior de doença cardíaca coronariana. A diabetes deste paciente estava bem controlada (julgada pela concentração de HbA_{1C}), mas seu nível de colesterol permaneceu alto, de modo que ele necessitou de tratamento com droga para reduzir os lipídios. Concentração baixa de HDL-colesterol é relativamente comum na diabetes tipo 2. Ao paciente foi prescrito uma droga redutora de lipídio (estatina) em adição ao tratamento com o derivado de sulfonilureia. A pressão sanguínea respondeu ao tratamento com um inibidor da ECA (Cap. 23).

A aterogênese é iniciada por disfunção endotelial

O evento inicial chave na aterosclerose é o dano ao endotélio (Figs. 18.7 e 18.8). Isto pode ser causado por excesso de lipoproteínas, hipertensão, diabetes ou por componentes da fumaça do cigarro. Inicialmente o dano é mais funcional do que estrutural. O endotélio perde sua qualidade de repelir células e passa a aderir células inflamatórias na parede vascular. Ele também se torna mais permeável às lipoproteínas que se depositam na íntima. Mais tarde, ocorrem dano estrutural ou uma completa destruição das células endoteliais.

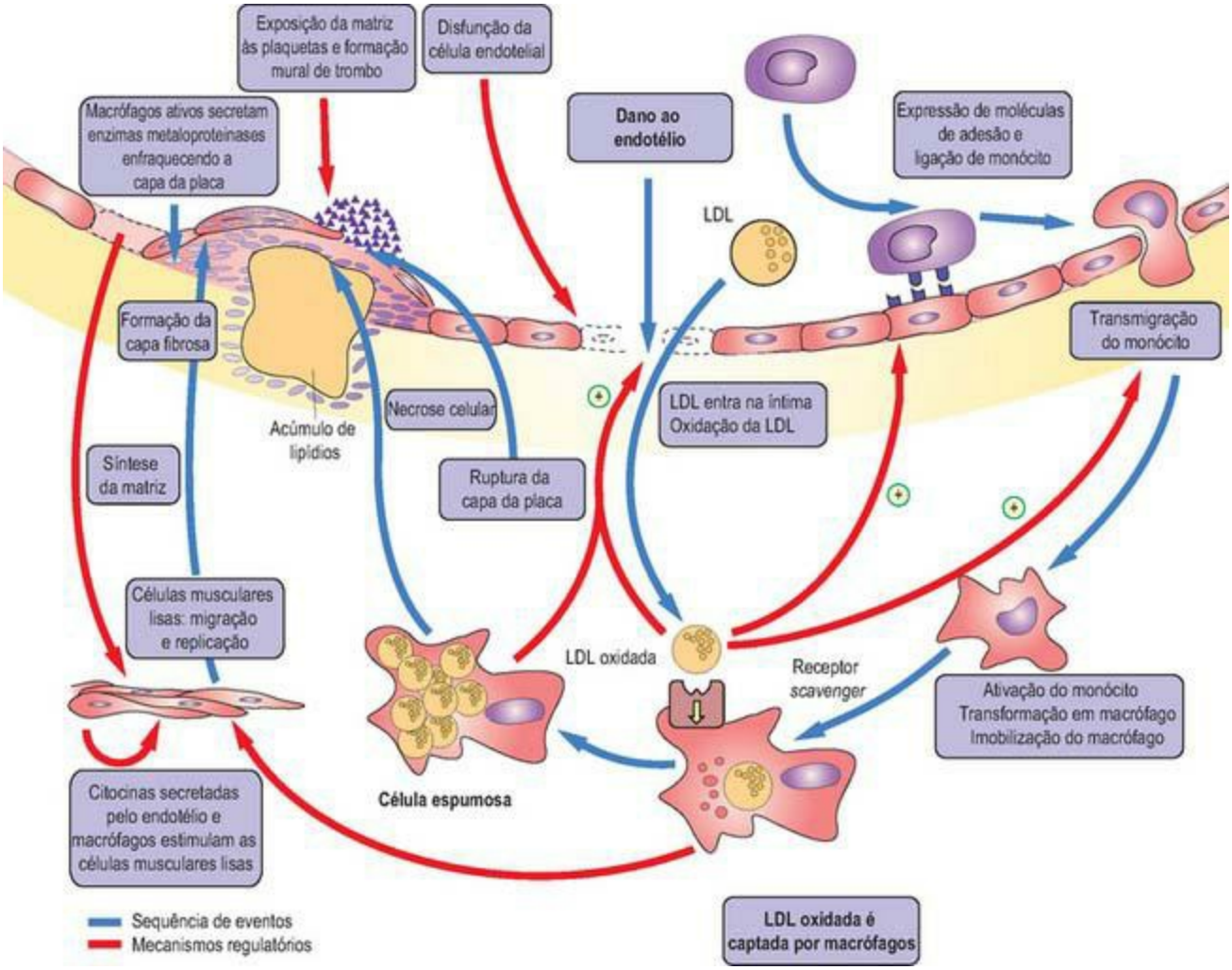


Fig. 18.7 Aterogênese: o processo. A aterogênese é dirigida por sinais mediados por citocinas e fatores de crescimento gerados pelas células endoteliais, macrófagos, linfócitos T e células musculares lisas vasculares (VSMC). Existem múltiplas vias de ativação: por exemplo, a expressão de MCP-1 e VCAM-1 podem ser estimuladas por sinais gerados pelos macrófagos assim como pela LDL oxidada. A VSMC pode ser estimulada pelas células endoteliais disfuncionais, por macrófagos e pelos linfócitos T (note também a ativação autócrina). Note que um hormônio, angiotensina II, também participa nestes processos. MCP-1, proteína 1 quimioatraente para monócito; VCAM-1, molécula 1 de adesão celular vascular; ICAM-1, molécula 1 de adesão celular intercelular; TNF-β, fator de necrose tumoral β; TNF-α, fator de necrose tumoral α; IFN-γ, interferon-γ; NO, óxido nítrico; PDGF, fator de crescimento derivado de plaqueta; bFGF, fator básico de crescimento de fibroblasto; IGF-1, fator 1 de crescimento tipo insulina; EGF, fator de crescimento epidermal; TGF-β, fator de crescimento transformante β; IL-1, interleucina-1.

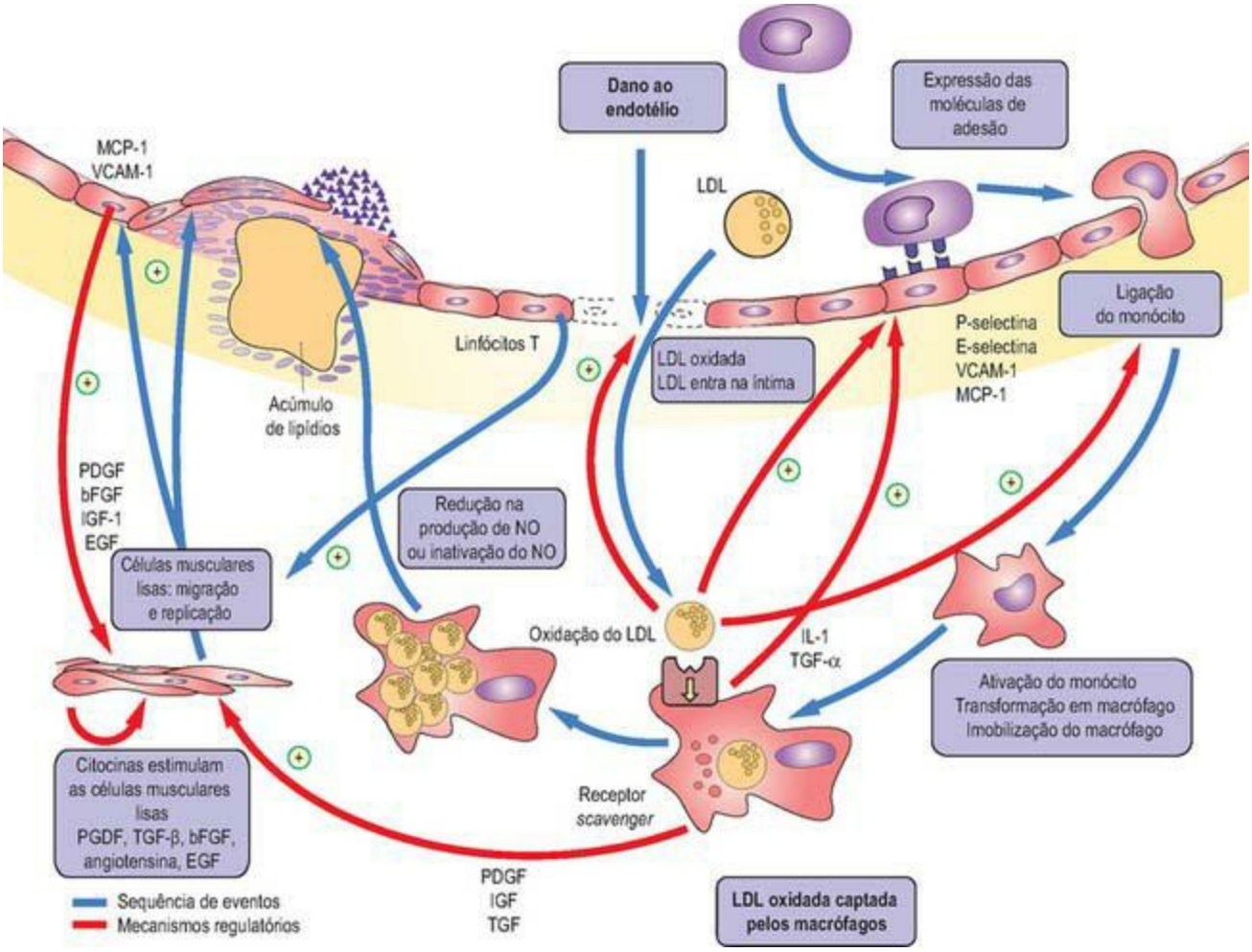


Fig. 18.8 Aterogênese: o papel dos fatores de crescimento e das citocinas. A aterogênese envolve disfunção endotelial, deposição de lipídios na Íntima arterial, reação inflamatória e a migração e proliferação de células musculares lisas vasculares. Note o papel dos lipídios oxidados na formação das células sobrecarregadas de lipídios e o centro lipídico da placa aterosclerótica. A sequência de eventos está descrita no texto. (Compare com a Figura 18.7.) As abreviações estão explicadas na Figura 18.7, pág. 230.

HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR CAUSA ATAQUES CARDÍACOS PRECOCES

Um fumante exagerado, de 32 anos de idade, desenvolveu uma repentina dor esmagadora no peito. Ele foi admitido no departamento de acidentes. O infarto do miocárdio foi confirmado por alterações no ECG e por alta concentração de troponina cardíaca. Ao exame, o paciente tinha xantoma no tendão das mãos e espessamento dos tendões de Aquiles. Existe uma forte história familiar de doença cardíaca coronariana (seu pai fez um enxerto para desvio coronariano com 40 anos de idade e seu avô paterno morreu de infarto do miocárdio com 50 anos). Seu colesterol era de 10.0 mmol/L (390 mg/dL), triglicerídeos 2 mmol/L (182 mg/dL) e HDL 1,0 mmol/L (38 mg/dL).

Comentário. Este paciente tem hipercolesterolemia familiar (FH), uma desordem autossômica dominante caracterizada por um número reduzido de receptores de LDL. A FH acarreta um risco muito alto de doença coronária prematura, e indivíduos heterozigotos podem sofrer ataques cardíacos tão precoces quanto na terceira ou quarta década de vida. A frequência dos FH homozigotos nas populações orientais é de aproximadamente 1:500. Este paciente foi imediatamente tratado com injeção intravenosa de ativador de plasminogênio tecidual. Subsequentemente ele sofreu um enxerto para desvio de artéria coronária e foi tratado com fármacos redutores de lipídios (estatinas). Sua concentração de colesterol diminuiu subsequentemente para 4,8 mmol/L (185 mg/dL), e o nível de

triglicerídeos (triacilglicerol) para 1,7 mmol/L, com o HDL-colesterol aumentando para 1,1 mmol/L (42 mg/dL).

CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PROTEÍNA C-REATINA REFLETE INFLAMAÇÃO CRÔNICA DE BAIXO GRAU QUE CONTRIBUI PARA A ATEROGÊNESE

A reação inflamatória associada com infecção pode ser detectada pela medida da concentração da proteína C-reativa no plasma (CRP), uma proteína sintetizada no fígado em resposta ao estímulo por citocinas pró-inflamatórias. Seu nome se origina de sua ligação ao polissacarídeo capsular (C) de bactérias, tais como o *S. pneumoniae*, o que medeia sua eliminação. Aumentos muito pequenos na concentração da CRP, que necessitam de métodos analíticos muito sensíveis para serem detectados, podem refletir processos inflamatórios crônicos nas paredes vasculares. Estudos epidemiológicos demonstraram uma associação entre a concentração de hsCRP e eventos cardiovasculares. Importante, esta associação é independente de ligação entre o colesterol plasmático e a doença coronariana. Concentrações plasmáticas aumentadas de outras moléculas pró-inflamatórias, tais como interleucina-6 (IL-6) e amiloide A sérico, também têm sido ligadas à doença cardíaca coronariana (compare com a Fig. 26.9).

A adesão celular ao endotélio disfuncional é mediada pelas moléculas de adesão presentes na sua superfície. Moléculas chamadas de selectinas medeiam as interações iniciais das células com o endotélio. A molécula-chave que promove a adesão dos monócitos (células brancas sanguíneas precursoras dos macrófagos) e os linfócitos T é a molécula-1 de adesão à célula vascular (VCAM-1). As células aderidas são estimuladas pela proteína-1 quimioatraente de monócito (MCP-1) para atravessar o endotélio e se alojar na íntima. Experimentos animais confirmam que a deficiência da VCAM-1 diminui a formação das placas ateroscleróticas.

Os monócitos também são atraídos para as placas em desenvolvimento pela citocina quimioatraente CCL2, que se liga aos receptores de monócitos. Na íntima, sob a influência do interferon-γ, fator de necrose tumoral (TNF), fator estimulante de colônia de granulócito e macrófago e o fator estimulante de colônia de monócito, secretados por células endoteliais e VSMC, os monócitos se transformam em macrófagos. Alguns macrófagos começam a produzir citocinas tais como IL-1β, IL-6 e TNF-α. Outros expressam receptores *scavenger* (tais como receptor *scavenger* classe A e CD36) e se tornam ativos na endocitose. Importante, os macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio que oxidam LDL na íntima.

A produção de NO no endotélio danificado diminui. Isto promove vasoconstrição. O NO normalmente reduz a adesão de monócitos e a migração e proliferação de VSMC, de modo que estes processos se tornam desinibidos.

A ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, além de seu efeito na pressão sanguínea, tem efeitos pró-aterogênicos. A angiotensina II (Cap. 23) contribui para a entrada da célula na íntima pelo aumento da expressão da VCAM-1 e MCP-1. Estudos clínicos mostram que fármacos que inibem aquele eixo (inibidores de ACE) são benéficos na prevenção cardiovascular.

A entrada de lipídios na parede arterial é um fator-chave na aterogênese

A hipercolesterolemia contribui para a indução de VCAM-1 e de MCP-1. A adesão de lipídios

na parede vascular é uma marca da aterosclerose. As partículas menores de lipoproteína, as remanescentes e a LDL são mais aterogênicas porque elas entram na parede vascular mais facilmente. Além disso, enquanto no plasma, as partículas de LDL são protegidas contra a oxidação pelos antioxidantes, tais como vitamina C e β-caroteno. Esta proteção é removida na íntima e fosfolipídios, e ácidos graxos presentes no LDL se tornam propensos à oxidação mediada por enzimas, tais como lipoxigenases, mieloperoxidase e NADPH oxidases que estão presentes nos macrófagos ativados. As LDLs oxidadas são bastante tóxicas ao meio ambiente. Elas estimulam a expressão de VCAM-1 e MCP-1. Elas danificam as células endoteliais e são mitogênicas para os macrófagos. A apolipoproteína da LDL, a apoB100, uma vez oxidada, se liga aos receptores *scavenger* em vez de se ligar ao receptor apoB/E. Devido aos receptores *scavenger* não serem regulados por retroalimentação através do nível intracelular de colesterol, os macrófagos que ingerem o LDL oxidado se sobrecarregam de lipídios. Como resultado, sua aparência se altera para as tão chamadas células espumosas: aglomerados de tais células conhecidos como estrias gordurosas são visíveis nas paredes arteriais. As células espumosas em processo de morte liberam os lipídios acumulados, que se juntam na íntima. Estes acúmulos se tornam centros de placas ateroscleróticas maduras.

A migração e a proliferação das células musculares lisas vasculares alteram a estrutura da parede vascular.

Todos estes eventos ocorrem na íntima arterial. Entretanto, a secreção de fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator-1 de crescimento tipo insulina (IGF-1), pelas células endoteliais e macrófagos, ativam a VSMC normalmente presente na média. A VSMC prolifera e migra para a íntima. Elas também secretam uma variedade de moléculas ativas sobre si mesmas: as moléculas de adesão, a MCP-1, assim como citocinas e fatores de crescimento, tais como interleucina-1 (IL-1) e TNF-α. A VSMC ativada também sintetiza matriz extracelular, em particular o colágeno, e o deposita na placa em crescimento. Tudo isto desfaz a estrutura normalmente organizada da parede arterial. As placas recentemente formadas podem se projetar para a luz da artéria, interferindo com o fluxo sanguíneo.

A inflamação tem um papel fundamental na aterogênese

A saída de monócitos e leucócitos T do plasma e sua ativação na íntima fazem parte da resposta inflamatória. Normalmente, tal resposta é iniciada por um antígeno ou trauma. Intrigantemente, nenhum antígeno específico capaz de iniciar a aterogênese foi identificado. Pode ser que exista um mimetismo molecular entre tais antígeno(s) e os patógenos exógenos (Cap. 38). O(s) antígeno(s) pode(m) ser agentes infecciosos ou moléculas modificadas geradas pelas espécies reativas de oxigênio. Por exemplo, o grupo fosforilcolina encontrado na LDL oxidada também é um componente do polissacarídeo capsular de bactéria. A LDL oxidada permanece como um antígeno candidato, que poderia ser responsável pela estimulação da reação inflamatória na aterogênese.

A aterogênese envolve ambas as imunidades, inata e adaptativa. A imunidade inata inclui o reconhecimento de moléculas pelos receptores *scavenger* A e CD36. Quando as moléculas que possuem padrões codificados na memória imune se ligam a estes receptores, elas ativam as células através, por exemplo, da via envolvendo o fator de transcrição NF-κB. As células T, envolvidas na imunidade adaptativa, também estão presentes nas lesões ateroscleróticas, e anticorpos circulantes do tipo IgG e IgM contra LDL modificada têm sido identificados no plasma (Cap. 38).

As prostaglandinas e os leucotrienos contribuem para a aterogênese

Deveria ser mencionado aqui o papel de moléculas de lipídios ativas, tais como as prostaglandinas, na aterogênese. A síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico é catalisada pela enzima ciclo-oxigenase (COX). A COX-1 nas plaquetas é inibida pela aspirina; isto diminui a produção do tromboxano A_2 pró-trombótico e é responsável pelo efeito cardioprotetor do fármaco. As prostaglandinas pró-inflamatórias, tais como a prostaglandina E_2 (PGE_2), contribuem para o processo inflamatório. Os leucotrienos (leucotrieno A4 e B4), outros lipídios derivados do ácido araquidônico, são gerados pela enzima 5-lipoxigenase e contribuem para o recrutamento de linfócitos para as lesões ateroscleróticas.

As placas ateroscleróticas crescem lentamente, mas o perigo real é a possibilidade súbita de ruptura

As células espumosas e o acúmulo de lipídio se tornam o centro das placas de ateroma. As VSMC, que migraram para a íntima, sintetizam uma matriz colagenosa que cobre o lipídio acumulado com uma "capa" fibrosa. A capa também contém VSMC, macrófagos ativados e linfócitos T. Uma placa madura, por um lado, penetra na parede arterial, e por outro lado obstrui a luz arterial (Fig. 18.9). Parte das lesões avançadas podem se tornar calcificadas.

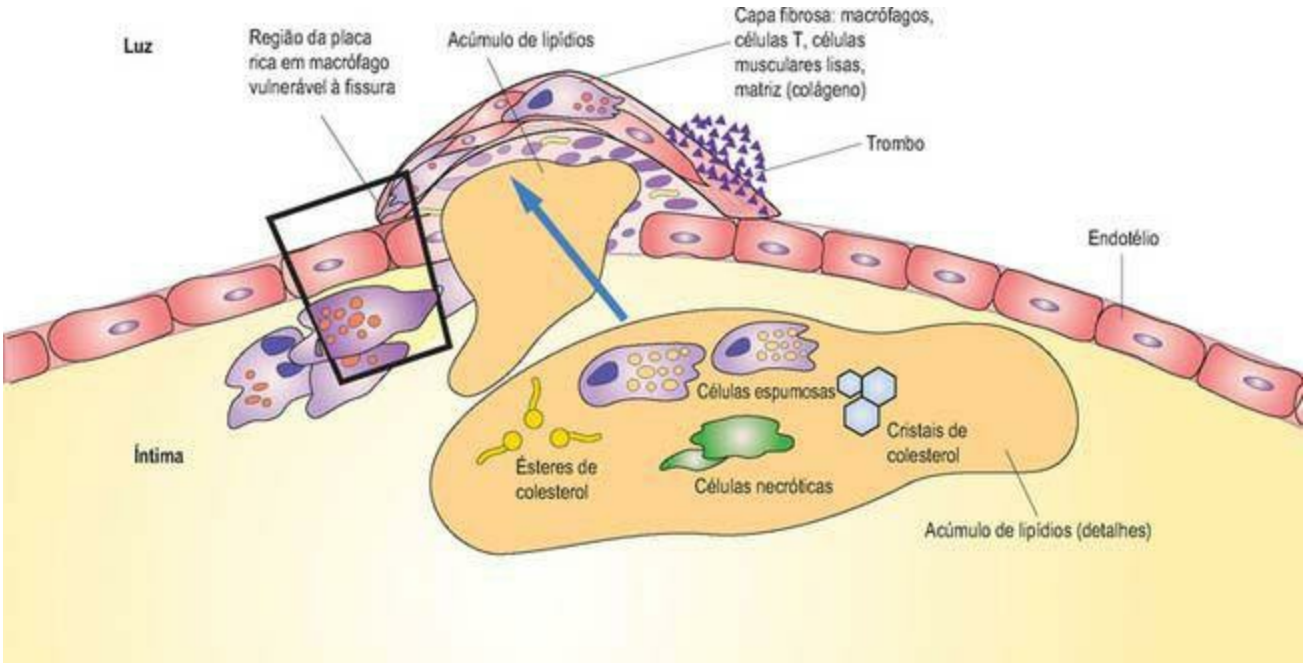


Fig. 18.9 Placa aterosclerótica. O centro lipídico e a capa fibrosa são as principais partes de uma placa aterosclerótica madura que emerge da parede vascular estruturalmente remodelada. A placa que é rica em células é instável e pode facilmente se romper. O processo-chave que leva à ruptura da placa é a digestão da matriz colagenosa da capa da placa por enzimas metaloproteinases. A figura ilustra áreas vulneráveis de quebra e mostra o trombo obstruidor que se forma no local da ruptura.

Importante, o crescimento da placa pode ser acelerado por um ciclo de ruptura da placa e trombose. Na placa, macrófagos ativados e linfócitos T residem preferencialmente na sua borda. Os macrófagos secretam enzimas que degradam a matriz extracelular, que pertencem à família de metaloproteinases (MMP), que inclui as colagenases, as gelatinases e a estromelisina. As proteases lisossomais (catepsinas) também contribuem degradando o colágeno e a elastina. Em adição, as células T ativadas pelos macrófagos secretam interferon-γ (IFN-γ) e citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-2 e TNF-α. O IFN-γ induz a expressão de MMP e inibe a síntese de colágeno pelas VSMC, enfraquecendo a capa. As VSMC presentes nas regiões de borda, mais vulneráveis da placa, podem

entrar em apoptose. Tal atividade na placa a torna propensa à ruptura. Quando a placa se rompe, ela expõe seu interior ao sangue. O interior da placa é altamente trombogênico devido à presença de fator tecidual, uma glicoproteína de baixo peso molecular que inicia a via extrínseca da cascata de coagulação (Cap. 7). As plaquetas também se tornam ativadas, e os trombos se formam rapidamente na superfície rompida. Tais trombos podem ocluir completamente a luz da artéria afetada. Isto interrompe a oferta de oxigênio e causa necrose tecidual na área irrigada pela artéria envolvida. Nem todos os casos de ruptura da placa resultam em completo bloqueio da luz e efeitos clínicos dramáticos. Entretanto, mesmo pequenas hemorragias e minúsculos trombos aceleram o crescimento da placa.

AVALIAÇÃO DO RISCO CARDIOVASCULAR

O risco cardiovascular é a probabilidade de que uma pessoa irá sofrer ataque cardíaco ou acidente vascular cerebral em um período definido no futuro. Os principais fatores de risco cardiovascular estão listados na Tabela 18.5. O conhecimento das concentrações plasmáticas das lipoproteínas é essencial para a avaliação do risco cardiovascular.

Tabela 18.5 Fatores de risco cardiovascular e seus controles. Os lipídios plasmáticos não são os únicos fatores que determinam o risco de doença cardiovascular. Esta tabela lista os fatores de risco cardiovasculares mais importantes e as estratégias de redução do risco usadas na prevenção cardiovascular.

Fatores de risco cardiovascular e seus controles		
Fator de risco	**Comentário**	**Remédio**
	a diferença no risco	

Sexo masculino	cardiovascular entre os sexos se iguala após a menopausa na mulher	
Idade		
Fumo		interrupção do fumo
Colesterol plasmático alto (alto LDL-colesterol)	2-3% de redução no risco para 1 % de redução no colesterol plasmático total	dieta pobre em gorduras saturadas e, quando apropriado, fármacos redutores de colesterol
HDL plasmático baixo		interrupção do fumo, exercícios regulares
Hipertensão	principal fator de risco para addente vascular cerebral e fator de risco para CHD	controlar a pressão sanguínea; dieta e fármacos
Obesidade		redução de peso
Estilo de vida sedentário		exercicios regulares
Diabetes	doença cardiovascular é a principal causa de morte no diabetes	dieta e fármacos (insulina na diabetes do tipo 1) (Cap. 21)

Estudos epidemiológicos mostram que o risco de doença cardiovascular está primariamente relacionado com as concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL-colesterol. Ele também é inversamente relacionado à concentração de HDL-colesterol. A inclusão dos triglicerídeos (na medicina clínica o termo triglicerídeo é usado em preferência à triacilglicerol) como determinantes de risco tem sido longamente discutida. Pesquisas recentes tornam bastante claro que eles contribuem para o risco. Particularmente interessantes são os dados que mostram uma associação entre as concentrações pós-prandiais (não jejum) de triglicerídeos e o risco de eventos futuros.

Até que as concentrações de colesterol sejam preocupantes, parece que não existe limite inferior no qual o risco poderia estabilizar (em outras palavras, quanto mais baixo, melhor). O risco claramente aumenta quando a concentração total de colesterol aumenta acima de 5,2 mmol/L (200 mg/dL). De acordo com o Programa Nacional Americano de Educação e Tratamento de Colesterol em Adultos, Painel III (ATPIII), o nível desejável de colesterol total é abaixo de 5,2 mmol/L (200 mg/dL) e o nível ótimo de LDL-colesterol é abaixo de 2,6 mmol/L (100 mg/dL).

GENÉTICA DA ATEROSCLEROSE

Os genes que codificam os receptores de LDL, as apolipoproteínas e os LRP6 são os únicos que têm sido ligados diretamente com as desordens ateroscleróticas. Entretanto, a expectativa é de que os novos estudos, de larga associação com o genoma, irão identificar características poligênicas mais complexas (Cap. 36). Dados recentes, particularmente interessantes, sugerem que os genes envolvidos na regulação do ciclo celular podem estar ligados à aterogênese. A habilidade técnica para realizar amplos exames do genoma mudou a forma com que este tipo de pesquisa é conduzido. Primeiramente, o acúmulo de resultados de muitos estudos simples poderia levar à elucidação de mecanismos e assim talvez uma busca de seu papel na doença. Em contraste, estudos amplos do genoma frequentemente fornecem evidência de associação entre uma condição patológica e um gene, antes que qualquer coisa seja conhecida sobre os mecanismos envolvidos. Somente mais tarde os investigadores iriam pesquisar os processos que podem sustentar tal afirmação.

Importante, a concentração "alvo" de colesterol precisa ser mais baixa em pessoas com risco aumentado de eventos cardiovasculares porque eles têm vários fatores de risco e naqueles que realmente têm doença relacionada com aterosclerose. Em tais pessoas, o ATPIII recomenda redução do LDL-colesterol para abaixo de 2,6 mmol/L (100 mg/dL) e até mesmo de 1,8 mmol/L (70 mg/dL).

As normas da Joint British Societies (JBS2) publicadas em 2005 recomendam que a concentração ótima de colesterol total em pessoas que têm risco cardiovascular aumentado seja 4 mmol/L (155 mg/dL), e a concentração ótima de LDL-colesterol seja 2,0 mmol/L (77 mg/dL). A concentração de triglicerídeos não deve ser maior do que 1,7 mmol/L.

Em contraste com um colesterol total ou LDL-colesterol alto, é a concentração de HDL-colesterol baixa que significa risco aumentado. A concentração de HDL-colesterol abaixo de 1 mmol/L (40 mg/dL) em homens ou 1,2 mmol/L (47 mg/dL) em mulheres é considerada indesejavelmente baixa, e uma concentração acima de 1,6 mmol/L (60 mg/dL) fornece alguma proteção contra doença coronariana. Os princípios dos testes de lipídios estão resumidos na Figura 18.10.

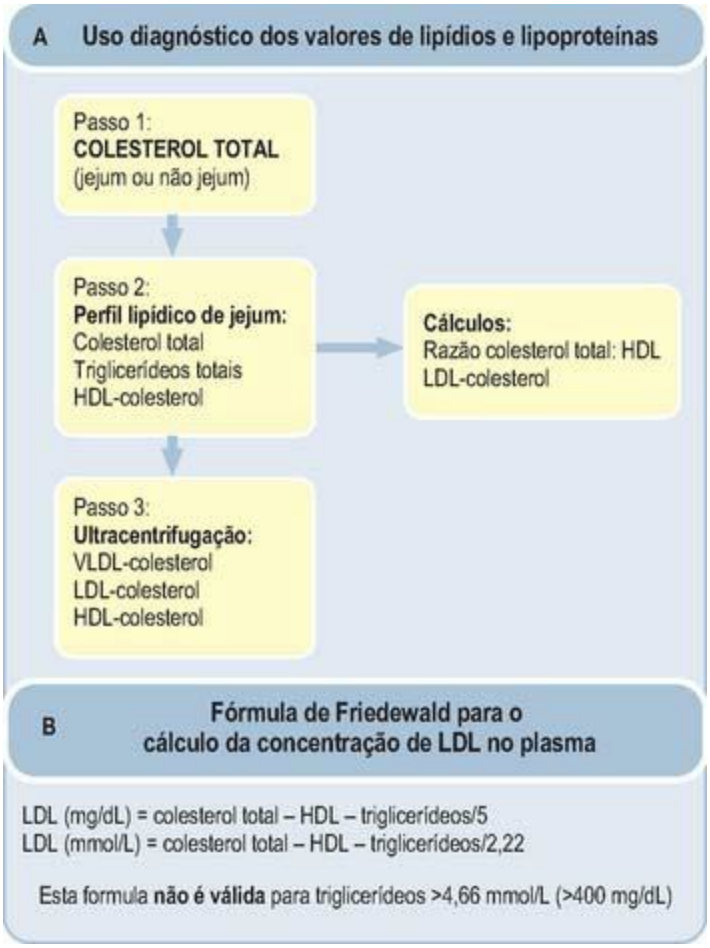


Fig. 18.10 Diagnóstico laboratorial das dislipidemias. (A) O teste inicial de pesquisa é a medida da concentração de colesterol total no plasma. O próximo passo, o perfil lipídico de jejum, inclui as medidas do colesterol total, colesterol presente na fração HDL (HDL-colesterol) e triacilgliceróis (triglicerídeos). Destes dados, a concentração de colesterol na fração LDL (LDL-colesterol) pode ser calculada. A análise das subfrações de lipoproteína usando o método de ultracentrifugação e as medidas de apolipoproteínas no plasma são testes especializados. A razão colesterol total/HDL é um importante marcador de risco cardiovascular: uma razão acima de 5 indica risco aumentado. Note que as recomendações Americanas ATPIII sugerem a realização do perfil lipídico de jejum como a investigação inicial, em vez de pesquisar somente o colesterol. (B) Cálculo da concentração de LDL-colesterol no plasma. O LDL-colesterol pode ser calculado a partir dos valores de colesterol total, triglicerídeos e HDL-colesterol, usando a fórmula de Friedewald.

Deve ser lembrado de que o risco associado com as concentrações plasmáticas dos "principais" lipídios pode ser modificado por outros fatores, tais como concentração aumentada de Lp(a), homocisteína plasmática, fibrinogênio ou proteína C-reativa (hsCRP). De fato, cerca de 50% das pessoas que sofrem de infarto do miocárdio apresentam concentrações "médias" de colesterol e LDL-colesterol. A busca de novos biomarcadores continua.

CONTROLE CLÍNICO DAS DISLIPIDEMIAS

Visto que, como nós discutimos, a aterosclerose é um processo multifatorial, a prevenção cardiovascular efetiva necessita de uma abordagem que combine modificação no estilo de vida (parar de fumar, dieta e exercício regular) com tratamento farmacológico da dislipidemia, hipertensão e diabetes (Tabela 18.5). A concentração plasmática de LDL (e consequentemente colesterol plasmático total) pode reduzir em aproximadamente 15% quando uma pessoa segue consistentemente uma dieta com baixo colesterol. Existem várias classes de fármacos que reduzem a concentração plasmática de colesterol.

MUDANÇAS NO ESTILO DE VIDA MELHORAM O PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO

Um homem de 57 anos de idade se dirige a uma clínica de estudos de lipídios por causa de hipertrigliceridemia (alta concentração de triacilglicerol). Seus triglicerídeos eram de 6 mmol/L (545 mg/dL), o colesterol 5 mmol/L (192 mg/dL) e o HDL 1 mmol/L (39 mg/dL). Ele estava obeso, ingeria 30 unidades de álcool por semana e tinha uma vida sedentária. Após dificuldades iniciais, ele se esforçou para perder 7 kg de peso em seis meses, cortou a bebida para menos de 30 unidades por semana e começou a se exercitar regularmente. Doze meses depois, seus triglicerídeos eram 2,5 mmol/L (227 mg/dL), o colesterol 4,8 mmol/L (186 mg/dL) e a HDL 1,2 mmol/L (46 mg/dL).

Comentário. A mudança no estilo de vida pode resultar em melhora apreciável no perfil lipídico. Para alcançar isto, os indivíduos precisam estar comprometidos com as mudanças no estilo de vida e na manutenção desta mudança por um período de tempo prolongado.

Nota: 1 unidade de álcool é uma medida (60 mL) de licor, um copo (170 mL) de vinho ou meia garrafa (300 mL) de cerveja.

As estatinas inibem a HMG-CoA redutase

As estatinas, tais como a sinvastatina, a pravastatina, a atorvastatina e a rosuvastatina são inibidores competitivos da HMG-CoA redutase, a enzima limitante da síntese do colesterol. Eles reduzem primariamente o LDL-colesterol do plasma. A inibição desta enzima resulta em diminuição na concentração intracelular de colesterol. Esta diminuição, através dos fatores de transcrição SREBP (Fig. 17.7), aumenta a expressão dos receptores de LDL na membrana celular. Um aumento no número de receptores celulares leva à captação celular aumentada de LDL e, consequentemente, a uma menor concentração plasmática de colesterol. O tratamento com estatinas reduz a concentração de colesterol em 30-60% (dependendo da preparação) e reduz eventos cardiovasculares futuros em 20-30%.

Os fibratos agem através do PPARα

Os derivados do ácido fíbrico (fibratos) são agonistas do fator de transcrição PPARα. Eles estimulam a LPL, reduzem as concentrações plasmáticas de triglicerídeos e aumentam a concentração de HDL. Seu efeito na LDL e no colesterol total é menos pronunciado do que o das estatinas.

A PRESENÇA DE XANTELASMA NÃO NECESSARIAMENTE INDICA DISLIPIDEMIA

Uma mulher de 28 anos de idade desenvolveu marcas amarelas de má aparência em torno de ambos os olhos (xantelasma). Ela era assintomática e tinha uma boa tolerância ao exercício. Seu colesterol era 5,0 mmol/L (192 mg/dL), os triglicerídeos 0,7 mmol/L (64 mg/dL) e sua HDL-colesterol era 1,4 mmol/L (53 mg/dL). Não existia história familiar de doença coronariana precoce.

Comentário. O xantelasma pode ocorrer em indivíduos com níveis lipídicos completamente normais. Por outro lado, depósitos lipídicos nos tendões (tendão xantomata) são sempre diagnósticos de desordem lipídica familiar. A paciente foi tranquilizada e indicada para cirurgia estética.

Os inibidores da absorção intestinal se ligam aos ácidos biliares e inibem o transporte de colesterol

Os inibidores da absorção intestinal de colesterol incluem fármacos antigos, as chamadas resinas ligantes de ácidos biliares, que agora raramente são utilizadas. Elas reduzem a concentração plasmática de colesterol pela interrupção da recirculação do colesterol do intestino e aumentando sua excreção. O fármaco mais novo ezetimiba inibe o transporte intestinal de colesterol e reduz o colesterol total em aproximadamente 20%. Estudos de longo prazo de seus benefícios clínicos estão em curso.

Os ácidos graxos ômega-3 reduzem a concentração de triglicerídeo

Uma redução substancial na concentração plasmática de triglicerídeos pode ser alcançada com o tratamento com ácidos graxos ômega-3 contidos no óleo de peixe.

O papel dos antioxidantes continua a ser estudado

Em animais, os antioxidantes, tais como o probucol ou vitamina E, inibem o desenvolvimento da aterosclerose. Estudos epidemiológicos mostraram que aqueles que tomam antioxidantes, tais como vitamina E e C ou β-caroteno, têm um risco reduzido de doença cardiovascular. Entretanto, estudos clínicos prospectivos do tratamento com antioxidantes falharam em confirmar tal efeito benéfico preventivo. Uma tentativa de explicação é que são os antioxidantes naturais (tais como aqueles contidos nas frutas) ou suas combinações que são protetores, em vez de simples substâncias puras.

Resumo

- As lipoproteínas transportam lipídios hidrofóbicos entre os órgãos e os tecidos.
- Os quilomícrons medeiam o transporte de gordura da dieta.
- A VLDL medeia o transporte de gordura endogenamente sintetizada.
- Os quilomícrons, a VLDL e as lipoproteínas remanescentes são parte da rede de distribuição de combustível do organismo: a via de transporte de combustível.
- LDL são lipoproteínas ricas em colesterol que emergem da via de transporte de combustível. Quando presentes em excesso, eles podem entrar na parede arterial.
- A HDL medeia o transporte reverso de colesterol, isto é, remoção do colesterol das células periféricas para o fígado.
- A aterogênese envolve disfunção endotelial, deposição de lipídio, reação inflamatória na parede arterial e ativação e proliferação de células musculares lisas arteriais.
- Interações entre diferentes tipos de células participantes na aterogênese são mediadas por uma série de citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão.
- A aterogênese rompe a estrutura da parede arterial e resulta na formação de placa aterosclerótica, que estreita a luz da artéria afetada. Entretanto, a causa imediata do ataque cardíaco não é o crescimento lento da placa, mas seu rompimento súbito.
- As doenças relacionadas com a arteriosclerose são a doença cardíaca coronariana, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Compare a composição da VLDL e da LDL.
2. Quais as diferenças entre o transporte de triacilgliceróis da dieta e os triacilgliceróis sintetizados no fígado?
3. Descreva a via de transporte para os ácidos graxos da dieta.
4. Dê exemplos das interações entre diferentes tipos celulares na aterogênese.
5. Como a placa aterosclerótica se rompe?
6. De que modo a disfunção endotelial contribui para a aterosclerose?

Leituras sugeridas

Dominiczak MH. Risk factors for coronary disease: the time for a paradigm shift? *Clin Chem Lab Med*. 2001;39:907-919.

Durrington P. Dyslipidaemia. *Lancet*. 2003;362:717-731.

Duval C, Muller M, Kersten S. PPAR alpha and dyslipidemia (review). *Biochim Biophys Acta Mol Biol Cell Biol Lipids*. 2007;1771:961-971.

Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285:2486-2497.

Grundy SM, Cleeman JI, Merz NB, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *Circulation*. 2004;110:227-239.

Harrison GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-1695.

Joint British Societies' guidelines on prevention of cardiovascular disease in clinical practice. *Heart*. 2005;91(Suppl V):V1-V52.

LaRosa JC. Low-density lipoprotein cholesterol reduction: the end is more important than the means. *Am J Cardiol*. 2007;100:240-242.

Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nature Med*. 2002;8:1257-1262.

Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*. 2008;451:904-913.

Sites

British Heart Foundation. www.bhf.org.uk/.

American Heart Association. www.americanheart.org.

National Heart, Lung and Blood Institute. www.nhlbi.nih.gov/nhlbi/nhlbi.htm/.

Biossíntese e Degradação de Aminoácidos

Allen B. Rawitch

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os três mecanismos utilizados pelos humanos para a remoção do nitrogênio dos aminoácidos, anterior ao metabolismo dos seus esqueletos de carbono.

- Delinear a sequência das reações do ciclo da ureia e traçar o fluxo do nitrogênio dos aminoácidos dentro e fora do ciclo.

- Descrever a função da vitamina B6 nas reações das aminotransferases.

- Definir os termos e dar exemplos de aminoácidos glicogênicos e cetogênicos.

- Resumir os fatores que contribuem para a absorção e a diminuição do *pool* de aminoácidos livres nos animais.

- Resumir as fontes e o uso da amônia nos animais e explicar o conceito de equilíbrio de nitrogênio.

- Identificar os aminoácidos essenciais e as fontes metabólicas dos aminoácidos não essenciais.

- Explicar as bases bioquímicas e os princípios da terapêutica para o tratamento da fenilcetonúria e da doença da urina em xarope de bordo.

INTRODUÇÃO

Além da sua função como blocos estruturais formadores de peptídios e proteínas, e precursores de neurotransmissores e hormônios, os aminoácidos são fontes de energia provenientes da dieta e durante o jejum. Os esqueletos de carbono de alguns aminoácidos podem ser utilizados para produzir glicose através da gliconeogênese, provendo assim um combustível metabólico para os tecidos que requerem ou preferem a glicose; esses aminoácidos são designados como aminoácidos glucogênicos ou glicogênicos. Os esqueletos de carbono de alguns aminoácidos podem também produzir o equivalente de acetil-CoA ou acetoacetato, e eles são denominados de cetogênicos; indicando que eles podem ser metabolizados para formar precursores imediatos de lipídeos ou corpos cetônicos. Em um indivíduo que consome quantidades adequadas de proteína, uma quantidade significativa de aminoácidos pode também ser convertida em carboidrato (glicogênio) ou gordura (triacilglicerol) para armazenamento. Ao contrário dos carboidratos e dos lipídeos, os aminoácidos não possuem uma forma de armazenamento equivalente ao do glicogênio ou da gordura.

Quando os aminoácidos são metabolizados, o excesso de nitrogênio resultante deve ser excretado. Uma vez que a forma primária na qual o nitrogênio é removido dos aminoácidos é a amônia, e, por ser a amônia livre muito tóxica, os seres humanos e a maioria dos animais superiores rapidamente convertem a amônia derivada do catabolismo do aminoácido em ureia, que é neutra, menos tóxica, muito solúvel e excretada na urina. Portanto, o produto primário da excreção de nitrogênio nos seres humanos é a ureia, produzida pelo ciclo da ureia no fígado. Os animais que excretam ureia são denominados de ureotélicos. Em uma média entre os indivíduos, mais de 80% do nitrogênio excretado estão na forma de ureia (25–30 g/24 h). Quantidades menores de nitrogênio também são excretadas na forma de ácido úrico, creatinina e Íon amônio.

Os esqueletos de carbono de muitos aminoácidos podem ser derivados dos metabólitos das vias centrais, permitindo a biossíntese de alguns aminoácidos em seres humanos. Os aminoácidos que podem ser sintetizados desta maneira não são, portanto, requeridos na dieta (aminoácidos não essenciais), enquanto os aminoácidos que têm os esqueletos de carbono que não podem ser derivados do metabolismo normal dos humanos têm de ser fornecidos pela dieta (aminoácidos essenciais). Para a biossíntese de aminoácidos não essenciais, grupos amino têm de ser adicionados aos esqueletos de carbono apropriados. Isso geralmente ocorre através da transaminação de um α-cetoácido correspondente àquele aminoácido específico.

METABOLISMO DAS PROTEÍNAS DA DIETA E ENDÓGENAS

Relação com o metabolismo central

Apesar das proteínas corporais representarem uma proporção significativa de reservas potenciais de energia (Tabela 19.1), sob circunstâncias normais elas não são utilizadas para a produção de energia. No entanto, durante um jejum prolongado, a proteína muscular é degradada em aminoácidos para a síntese de proteínas essenciais e os cetoácidos para a gliconeogênese, a fim de manter a concentração de glicose no sangue. Esses processos são responsáveis pela perda de massa muscular durante o jejum.

Tabela 19.1 Formas de armazenamento de energia no corpo. As pro-teínas representam uma reserva substancial de energia do corpo.

Combustível armazenado	Tecido	Quantidade (g)*	Energia (KJ)	(Kcal)
Glicogênio	fígado	70	1.176	280
Glicogênio	músculo	120	2.016	480
Glicose livre	fluidos corporais	20	336	80
Triacilglicerol	adiposo	15.000	567.000	135.000
Proteína	músculo	6.000	100.800	24.000

*em um indivíduo com 70 kg.

Além da sua função como uma importante fonte de esqueletos de carbono para o metabolismo oxidativo e a produção de energia, as proteínas da dieta têm de fornecer quantidades adequadas daqueles aminoácidos que nós não podemos sintetizar, para sustentar a síntese normal de proteínas. As relações da proteína corporal e da proteína da dieta com os *pools* centrais de aminoácidos e o metabolismo central estão ilustradas na Figura 19.1.

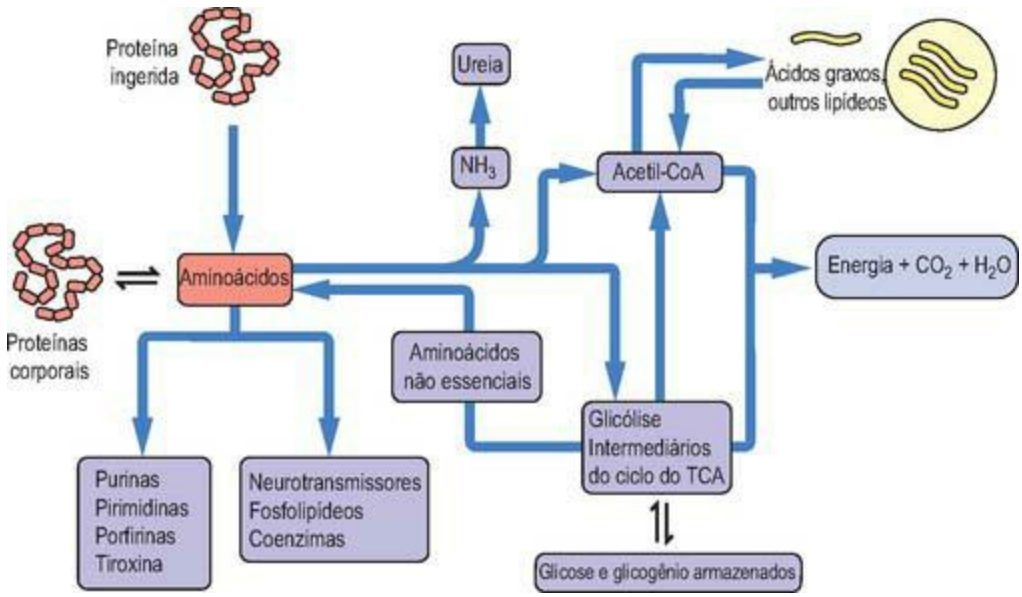


Fig. 19.1 Relações metabólicas entre os aminoácidos. O *pool* de aminoácidos livres é derivado da degradação e do *turnover* de proteínas corporais e da dieta. Os aminoácidos são precursores de importantes biomoléculas, incluindo hormônios, neurotransmissores e proteínas, e servem também como uma fonte de carbono para o metabolismo central, incluindo gliconeogênese, lipogênese e produção de energia.

Digestão e absorção das proteínas da dieta

A fim da proteína da dieta contribuir tanto para o metabolismo energético quanto para o *pool* de aminoácidos essenciais, a proteína precisa ser digerida a aminoácidos livres ou pequenos peptídios e absorvida através do intestino. A digestão da proteína começa no estômago com a ação da pepsina, uma protease com um grupo carboxila que é ativa em um pH muito baixo encontrado no ambiente gástrico. A digestão continua à medida que o conteúdo estomacal é transferido para o intestino delgado e misturado com as secreções pancreáticas. Essas secreções pancreáticas são alcalinas e contêm os precursores inativos de várias serinoproteases, incluindo a tripsina, a quimotripsina e a elastase, além das carboxipeptidases. O processo é completado pelas enzimas no intestino delgado (Cap. 10). Depois que todos os di- ou tripeptídios remanescentes são degradados nos enterócitos, os aminoácidos livres são transportados para a veia porta e levados ao fígado para o metabolismo energético ou biossíntese, ou distribuídos para os outros tecidos a fim de satisfazerem necessidades semelhantes.



A ALANINA E O FLUXO DE CARBONO E NITROGÊNIO ENTRE ÓRGÃOS

Grande parte do fluxo de carbono que acontece entre os tecidos periféricos, como o músculo esquelético e o fígado, é facilitado pela liberação de alanina no sangue pelos tecidos periféricos. A alanina é convertida em piruvato no fígado, e o componente nitrogênio é incorporado à ureia. O piruvato pode ser utilizado na gliconeogênese para produzir glicose, que é liberada no sangue para retornar aos tecidos periféricos. Esse "ciclo glicose-alanina" permite a conversão líquida dos carbonos do aminoácido à glicose, a eliminação do nitrogênio do aminoácido como ureia e o retorno dos carbonos para os tecidos periféricos na forma de glicose (Cap. 21). Esse ciclo funciona de uma maneira similar ao ciclo de Cori (Cap. 21) no qual o lactato, liberado pelo músculo esquelético, é utilizado na gliconeogênese hepática, e a diferença-chave é que a alanina também transporta um átomo de nitrogênio para o fígado. A alanina e a glutamina são liberadas pelo músculo esquelético em quantidades aproximadamente iguais e representam quase 50% dos aminoácidos liberados pelo músculo esquelético no sangue – uma quantidade que, de longe, excede a proporção desses aminoácidos nas proteínas musculares. Assim, existe um remodelamento substancial dos aminoácidos derivados de proteínas pelas reações de transaminação, anterior a sua liberação pelo músculo.

Turnover das proteínas endógenas

Além da ingestão, digestão e absorção dos aminoácidos provenientes da proteína da dieta, todas as proteínas no corpo têm uma meia-vida ou longevidade e são rotineiramente degradadas em aminoácidos e substituídas por proteínas recém-sintetizadas. Este processo de *turnover* da proteína é realizado no lisossomo ou pelos proteossomas. No caso da digestão lisossomal, o *turnover* da proteína começa com o englobamento da proteína ou organela em vesículas conhecidas como autofagossomas, por um processo conhecido como autofagia. As vesículas se fundem então com os lisossomos e as proteínas, os lipídeos e as glicanas são degradados pelas hidrolases ácidas lisossomais. As proteínas citosólicas são degradadas primeiramente pelos proteossomas, que são complexos de alto peso molecular contendo múltiplas atividades proteolíticas. Existem duas vias, ubiquitina dependente (Cap. 29) e ubiquitina independente, para a degradação das proteínas citosólicas.

DEGRADAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos destinados para o metabolismo energético têm que ser desaminados para produzirem o esqueleto de carbono. Existem três mecanismos para a remoção do grupo amino dos aminoácidos.

- **Transaminação** – a transferência do grupo amino para um cetoácido aceptor adequado (Fig. 19.2);

- **Desaminação oxidativa** – a remoção oxidativa do grupo amino, resultando em cetoácidos e amônia (Fig. 19.5);

- **Remoção de uma molécula de água pela desidratase** – por exemplo, serina ou treonina desidratase; essa reação produz um intermediário imina instável, que se hidrolisa espontaneamente para produzir um α-cetoácido e amônia (Fig. 19.5).

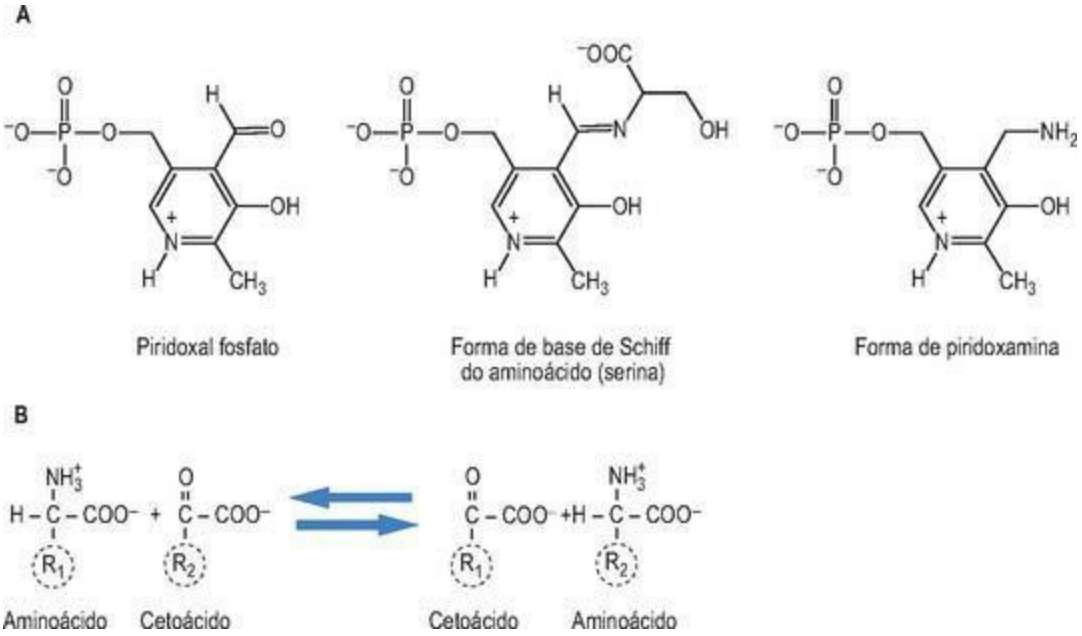


Fig. 19.2 O papel catalítico do piridoxal fosfato. As aminotransferases ou transaminases utilizam o piridoxal fosfato como um cofator. O aduto de piridoxamina atua como um intermediário na transferência do grupo amino entre um α-aminoácido e um α-cetoácido. (A) Estruturas dos componentes envolvidos. O cofator, piridoxal fosfato, é utilizado em uma variedade de reações catalisadas por enzimas envolvendo tanto os componentes amino e ceto, incluindo as reações de transaminação e descarboxilação. (B) A transaminação envolve tanto um doador α-aminoácido (R_1), quanto um aceptor α-cetoácido (R_2). Os produtos são um α-cetoácido derivado do esqueleto de carbono de R_1 e um α-aminoácido do esqueleto de carbono R_2.

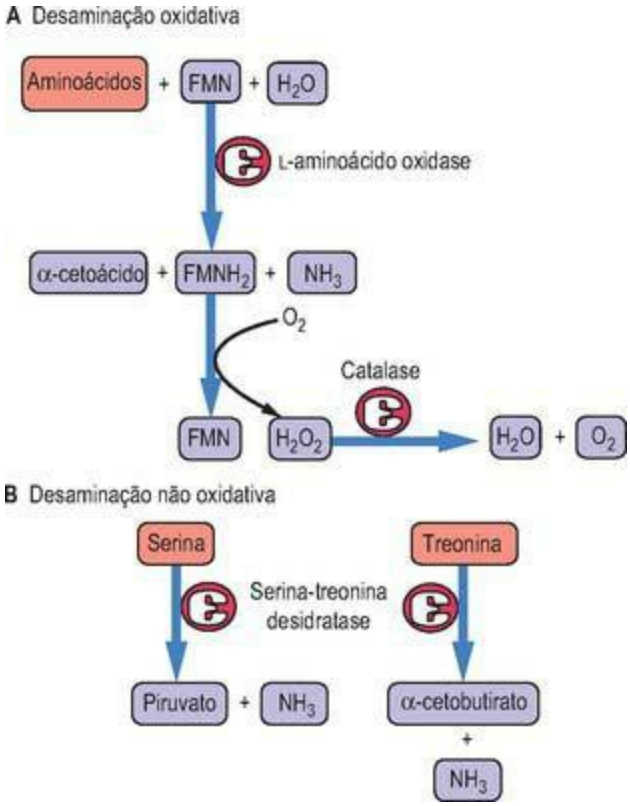


Fig. 19.5 Desaminação dos aminoácidos. A rota primária para a remoção do grupo amino se dá via transaminação, porém existem enzimas adicionais capazes de remover o grupo α-amino. (A) $_L$-aminoácido oxidase produz amônia e um α-cetoácido diretamente, utilizando a flavina mononucleotídeo (FMN) como cofator. A forma reduzida da flavina tem de ser regenerada utilizando o oxigênio molecular; essa reação é uma das várias que produzem H_2O_2. O peróxido é decomposto pela catalase. (B) Um segundo meio de desaminação é possível somente para os hidroxiaminoácidos (serina e treonina), através do mecanismo de uma desidratase; a base de Schiff, um intermediário imina, sofre hidrólise para formar um cetoácido e amônia.

MEDIÇÃO DO NITROGÊNIO UREICO NO SANGUE

As medições da ureia sanguínea (também reportada pelos laboratórios como BUN ou nitrogênio ureico no sangue) são críticas no monitoramento de pacientes com uma variedade de doenças metabólicas, nas quais o metabolismo dos aminoácidos pode estar afetado e no rastreamento das condições de indivíduos com problemas renais. A metodologia tradicional utilizada para medir a ureia no sangue se baseia na ação da enzima urease, que converte a ureia em CO_2 e amônia. A amônia resultante pode ser detectada espectrofotometricamente pela formação de um composto colorido após a reação com fenol ou um composto relacionado (reação de Berthelot).

REAÇÃO AO GLUTAMATO MONOSSÓDICO

Uma mulher saudável de 30 anos de idade apresentou um início súbito de dor de cabeça, sudorese e náusea após comer em um restaurante oriental. Ela se sentiu fraca e apresentou formigamento e uma sensação de calor em sua face e na parte superior do tronco. Os sintomas passaram em cerca de 30 minutos, e ela não apresentou problemas posteriores. Após consultar seu médico no dia seguinte, ela aprendeu que alguns indivíduos reagem a comidas contendo altos níveis do aditivo alimentar glutamato monossódico, o sal de sódio do ácido glutâmico.

Comentário. Os sintomas semelhantes aos da gripe que desenvolveu, previamente descrito como "síndrome do restaurante chinês", foram atribuídos aos efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC) do glutamato ou do seu derivado, o neurotransmissor inibitório, ácido γ-aminobutírico (GABA). Interessantemente, estudos mostraram que esse fenômeno não causa um dano permanente ao SNC e que, apesar do broncoespasmo poder ser desencadeado em indivíduos com asma severa, os sintomas são geralmente breves e completamente reversíveis.

Os metabolismos do esqueleto de carbono e do grupo amino são coordenados

O mecanismo principal para a remoção dos grupos amino dos aminoácidos comuns se dá via transaminação, isto é, pela transferência do grupo amino do aminoácido para um α-cetoácido aceptor adequado, mais comumente para o α-cetoglutarato ou o oxalacetato. Várias enzimas, chamadas de aminotransferases (ou transaminases), são capazes de remover o grupo amino da maioria dos aminoácidos e produzir o α-cetoácido correspondente. As enzimas aminotransferases utilizam o piridoxal fosfato, um cofator derivado da vitamina B_6 (piridoxina), como um componente fundamental em seu mecanismo catalítico; a piridoxamina é um intermediário da reação. As estruturas das várias formas de vitamina B_6 e a reação resumida catalisada pelas aminotransferases são mostradas na Figura 19.2.

Os átomos de nitrogênio são incorporados à ureia a partir de duas fontes

A transferência de um grupo amino de um esqueleto de carbono de um cetoácido para outro pode parecer improdutiva e inútil por si só; no entanto, quando consideramos a natureza dos cetoácidos aceptores primários que participam nessas reações (α-cetoglutarato e oxalacetato) e seus produtos (glutamato e aspartato), a lógica desse metabolismo se torna clara. Os dois átomos de nitrogênio incorporados à ureia são derivados exclusivamente dessas duas fontes (Fig. 19.3), ligando assim o catabolismo do aminoácido ao metabolismo energético. A amônia, que é produzida primariamente a partir do glutamato, via reação da glutamato desidrogenase (GDH) (Fig. 19.4B), entra no ciclo da ureia como carbamoil fosfato. O segundo nitrogênio é fornecido à ureia pelo ácido aspártico. O fumarato é formado nesse processo e pode ser reciclado através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) em oxalacetato, que pode aceitar outro grupo amino e entrar novamente no ciclo da ureia ou o fumarato pode ser utilizado no metabolismo energético ou na gliconeogênese. Desse modo, a canalização dos grupos amino, a partir de outros aminoácidos, em glutamato e aspartato fornece o nitrogênio para a síntese de ureia de uma forma apropriada para o ciclo da ureia (Fig. 19.3). As outras vias que levam à liberação dos grupos amino de alguns aminoácidos através da ação da aminoácido oxidase ou desidratases (Fig. 19.5) têm uma contribuição relativamente menor para o fluxo dos grupos amino dos aminoácidos para a ureia.

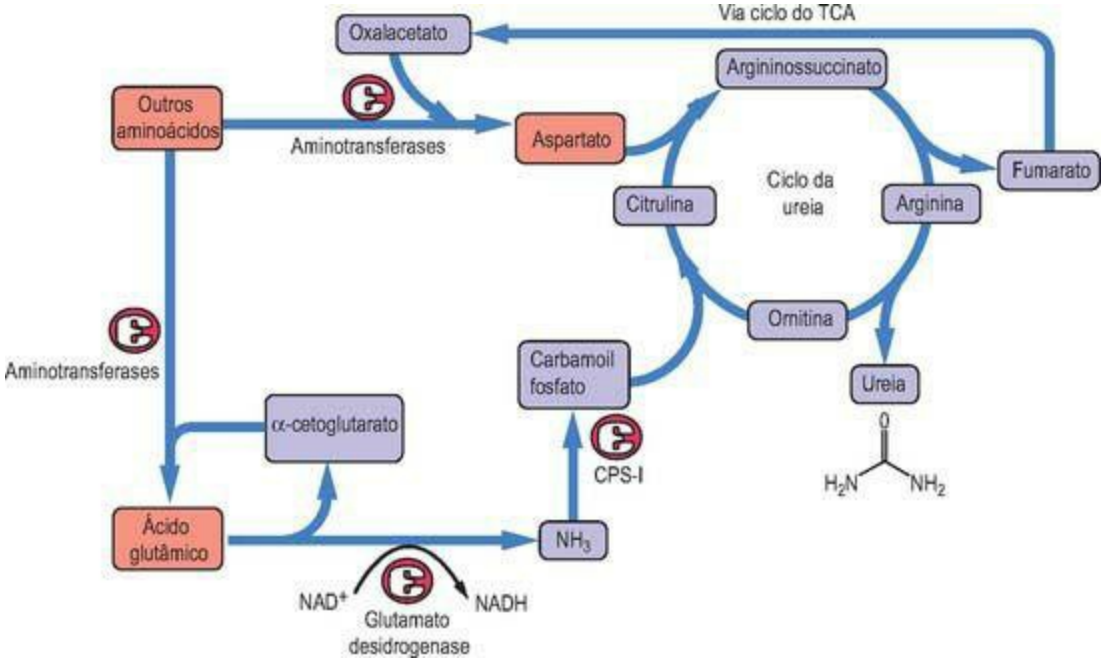


Fig. 19.3 Fontes de átomos de nitrogênio no ciclo da ureia. O nitrogênio entra no ciclo da ureia proveniente da maioria dos aminoácidos via transferência do grupo α-amino para o oxalacetato ou para o α-cetoglutarato, para formar o aspartato ou glutamato, respectivamente. O glutamato libera amônia no fígado através da ação da GDH. A amônia é incorporada ao carbamoil fosfato e o aspartato se combina com a citrulina para fornecer o segundo nitrogênio para a síntese de ureia. O oxalacetato e o α-cetoglutarato podem ser reciclados repetidamente para canalizar o nitrogênio dentro dessa via. CPS-I, carbamoil fosfato sintetase-I.

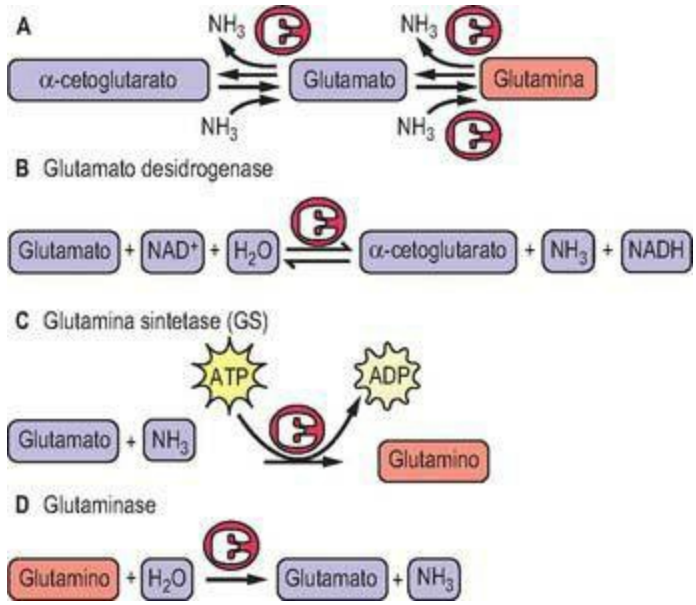


Fig. 19.4 Relações entre glutamato, glutamina e α-cetoglutarato. As várias formas do esqueleto de carbono do ácido glutâmico têm funções-chave no metabolismo dos grupos amino. (A) Três formas do mesmo esqueleto de carbono. (B) A reação da GDH é uma reação reversível que pode produzir glutamato a partir do α-cetoglutarato ou converter glutamato em α-cetoglutarato e amônia. Essa última reação é importante na síntese da ureia porque os grupos amino são transferidos ao α-cetoglutarato via transaminação a partir de outros aminoácidos. (C) A glutamina sintetase catalisa uma reação, que requer energia, com uma função importante no transporte dos grupos amino de um tecido para outro; ele também fornece um tampão contra as altas concentrações de amônia livre nos tecidos. (D) A segunda metade do sistema de transporte da glutamina para o nitrogênio utiliza a enzima glutaminase, que hidrolisa a glutamina em glutamato e amônia. Essa reação é importante no rim para o gerenciamento do transporte de prótons e o controle do pH. GDH, glutamato desidrogenase.

A função central da glutamina

Além da função do glutamato como um transportador dos grupos amino através da GDH, o glutamato serve como precursor da glutamina, um processo que consome uma molécula de amônia. Isso é importante porque a glutamina, juntamente com a alanina, é o transportador-chave dos grupos amino entre os vários tecidos e o fígado e está presente em maiores concentrações do que a maioria dos outros aminoácidos no sangue. As três formas do mesmo esqueleto de carbono, α-cetoglutarato, glutamato e glutamina, são interconvertidas via aminotransferases, glutamina sintetase, glutaminase e GDH (Fig. 19.4). Dessa forma, a glutamina pode servir como um tampão para a utilização da amônia, como uma fonte de amônia, e como um transportador dos grupos amino. Devido à amônia ser muito tóxica, um equilíbrio tem de ser mantido entre a sua produção e utilização. Um resumo das fontes e vias que utilizam ou produzem amônia é mostrado na Figura 19.6. Deve-se notar que a reação da GDH é reversível sob condições fisiológicas caso os grupos amino sejam requeridos para os aminoácidos e outros processos biossintéticos.

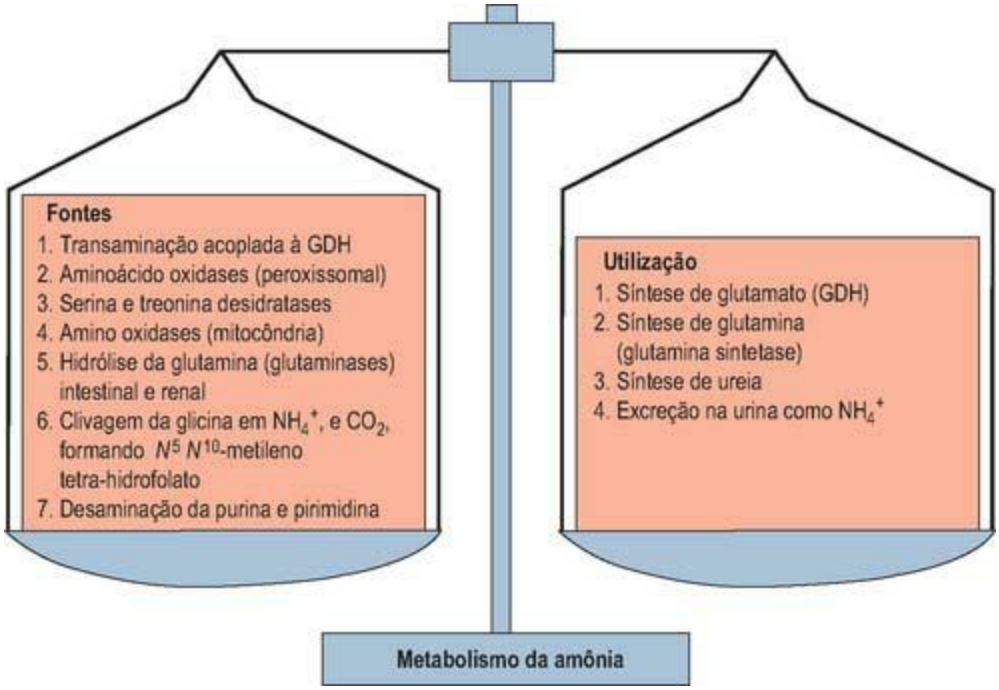


Fig. 19.6 Equilíbrio no metabolismo da amônia. O equilíbrio entre a produção e a utilização da amônia livre é crítico para a manutenção da saúde. Esta figura resume as fontes e as vias que utilizam amônia. Embora a maior parte dessas reações ocorra em muitos tecidos, a síntese da ureia é restrita ao fígado. A glutamina e a alanina funcionam como transportadores primários de nitrogênio dos tecidos periféricos para o fígado.

O ciclo da ureia e sua relação com o metabolismo central

A ureia é o principal produto da excreção do nitrogênio nos humanos (Tabela 19.2). O ciclo da ureia (Fig. 19.3) foi o primeiro ciclo metabólico a ser bem definido; sua descrição precede a do ciclo do TCA. O início do ciclo da ureia pode ser considerado como a síntese de carbamoil fosfato a partir do íon amônio, derivado primariamente do glutamato via GDH (Fig. 19.3) e do bicarbonato na mitocôndria do fígado. Essa reação requer duas moléculas de ATP e é catalisada pela enzima carbamoil fosfato sintetase I (CPS I) (Fig. 19.7), que é encontrada em altas concentrações na matriz mitocondrial.

Tabela 19.2 Excreção urinária de nitrogênio.

Excreção urinária de nitrogênio		
Metabólito urinário	**g excretado/24 h***	**% do total**
Ureia	30	86
Íon amônio	0.7	2.8
Creatinina	1.0-1.8	4-5
Áddo úrico	0.5-1.0	2-3

* *Valores aproximados em média de um bomem adulto.*

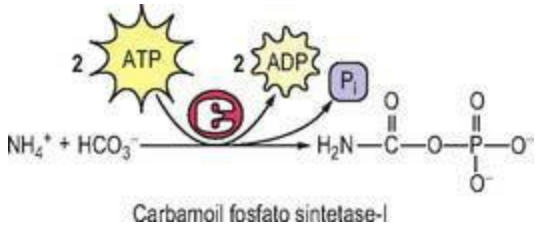


Fig. 19.7 Síntese de carbamoil fosfato. O primeiro nitrogênio, derivado da amônia, entra no ciclo da ureia como carbamoil fosfato, sintetizado pela carbamoil fosfato sintetase I, no fígado.

A isoenzima mitocondrial, CPS I, é incomum, no sentido de que ela requer a *N*-acetilglutamato como cofator. Esta enzima é uma das duas enzimas carbamoil fosfato sintetase, que tem função chave no metabolismo. A segunda, CPS II, é encontrada no citosol, não requer a *N*-acetilglutamato e está envolvida na biossíntese de pirimidina.

A ornitina transcarbamoilase catalisa a condensação de carbamoil fosfato com o aminoácido ornitina, para formar a citrulina: Figura 19.3 para a via e Tabela 19.3 para as estruturas. Por sua vez, a citrulina é condensada com o aspartato para formar argininossuccinato. Essa etapa é catalisada pela argininossuccinato sintetase e requer ATP; a reação cliva o ATP em adenosina monofosfato (AMP) e pirofosfato inorgânico (PPi) (2 equivalentes de ATP). A formação de argininossuccinato incorpora o segundo átomo de nitrogênio destinado à ureia. O argininossuccinato é clivado pela argininosuccinase em arginina e fumarato, e a arginina é, então, clivada pela arginase para a produção de ureia e ornitina. A ornitina pode entrar novamente no ciclo da ureia, enquanto a ureia se difunde no sangue, é transportada para o rim e é excretada na urina. O processo líquido da ureogênese está resumido na Tabela 19.4.

Tabela 19.3 Enzimas do ciclo da ureia. Cinco enzimas catalisam o ciclo da ureia no fígado. A primeira enzima, CPS-I, que fixa NH_4^+ como carbamoil fos-fato, é a enzima reguladora e é sensível ao efetor alostérico W-acetilglutamato.

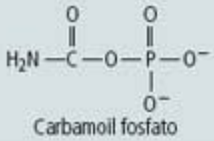
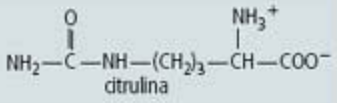
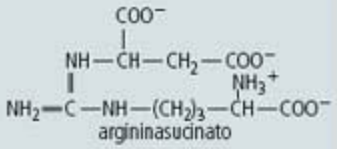
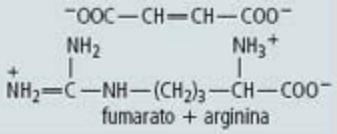
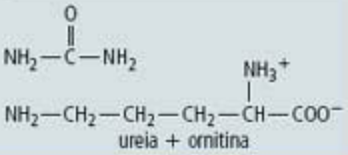
Enzima	Reação catalisada	Observações	Produto da reação
Carbamoil fosfato sintetase	formação de carbamoil fosfato a partir de amônia e CO_2	fixa a amônia liberada pelos aminoácidos, utiliza 2 ATPs, localizada na **mitocôndria**, a deficiência leva a altas concentrações de amônia no sangue e toxicidade relacionada	 Carbamoil fosfato
Ornitina transcarbamoilase	formação de citrulina a partir de ornitina e carbamoil fosfato	libera P_i, um exemplo de transferase, localizada na **mitocôndria**, a deficiência leva a altas concentrações de amônia e ácido orótico no sangue, enquanto o carbamoil fosfato é desviado para a biossíntese de pirimidina	 citrulina
Argininossuccinato sintetase	formação de argininossuccinato a partir de citrulina e aspartato	requer ATP, que é clivado em AMP + PP_i – um exemplo de ligase, localizada no **citosol**, a deficiência leva a altas concentrações de amônia e citrulina no sangue	 argininasuccinato
Arginino succinase	clivagem da argininossuccinato em arginina e fumarato	um exemplo de liase, localizada no **citosol**, a deficiência leva a altas concentrações de amônia e citrulina no sangue	 fumarato + arginina
Arginase	clivagem de arginina em ornitina e ureia	um exemplo de hidrolase, localizada no **citosol**, e principalmente no fígado, a deficiência leva a um aumento moderado de amônia no sangue e altas concentrações de arginina no sangue	 ureia + ornitina

Tabela 19.4 Síntese de ureia.

Síntese de ureia

Reações componentes da sintese de ureia

$CO_2 + NH_3 + 2$ ATP	→	carbamoil fosfato + 2ADP + P_i
Carbamoil fosfato + ornitina	→	citrulina + P_i
Citrulina + aspartato + ATP	→	argininossuccinato + AMP + PP_i
Argininossuccinato	→	arginina + fumarato
Arginina	→	ureia + ormitina
$CO_2 + NH_3 + 3$ ATP + aspartato	→	ureia + 2ADP + AMP + 2 P_i + PP_i + fumarato

O ciclo da ureia está dividido entre a matriz mitocondrial e o citosol

As duas primeiras etapas do ciclo da ureia ocorrem na mitocôndria. A citrulina que é formada na mitocôndria é movida, então, para o citosol por um sistema de transporte passivo específico. O ciclo é completado no citosol com a liberação da ureia a partir da arginina e a regeneração da ornitina. A ornitina é transportada de volta através da membrana mitocondrial para continuar o ciclo. Os carbonos do fumarato, liberados na etapa da argininosuccinase, podem também entrar novamente na mitocôndria após a hidratação em malato e ser reciclado pelas enzimas do ciclo do TCA em oxalacetato e por último em aspartato (Fig. 19.8), completando assim a segunda parte do ciclo da ureia. A síntese da ureia ocorre quase que exclusivamente no fígado, e a função da enzima arginase, em outros tecidos é, provavelmente, relacionada mais intimamente com os requerimentos de ornitina naqueles tecidos do que com a produção de ureia.

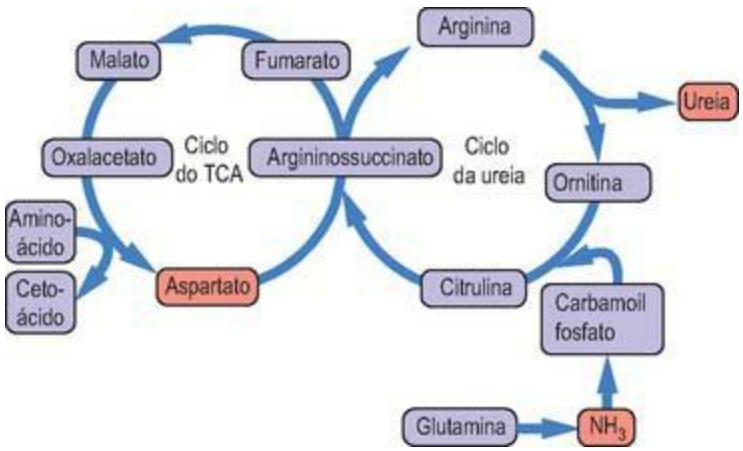


Fig. 19.8 Os ciclos do ácido tricarboxílico e da ureia. Análises do ciclo da ureia revelam que na realidade são dois ciclos, com o fluxo de carbono dividido entre o processo sintético primário de ureia e a reciclagem do fumarato em aspartato; o último ciclo ocorre na mitocôndria e envolve partes do ciclo do TCA.

SíNTESE DE CARBAMOIL FOSFATO

A enzima carbamoil fosfato sintetase I (CPS I) é encontrada na mitocôndria e primariamente no fígado; uma segunda enzima, CPS II, é encontrada no citosol e em praticamente todos os tecidos.

Embora o produto de ambas as enzimas seja o mesmo, chamado de carbamoil fosfato, as enzimas são derivadas de genes diferentes e funcionam na ureogênese (CPS I) ou biossíntese de pirimidina (CPS II), respectivamente. Outras diferenças entre as duas enzimas incluem suas fontes de nitrogênio (NH_3 para a CPS I e glutamina para CPS II) e seu requerimento por *N*-acetilglutamato (requerido pela CPS I, mas não pela CPS II). Sob circunstâncias normais, as CPS I e II funcionam independentemente e em compartimentos celulares diferentes; no entanto, quando o ciclo da ureia é bloqueado, por exemplo, como resultado de uma deficiência na ornitina transcarbamoilase, o carbamoil fosfato mitocondrial acumulado passa para o compartimento citosólico e pode estimular em excesso a síntese de pirimidina, resultando no acúmulo de ácido orótico no sangue e na urina.

A TOXICIDADE DA AMÔNIA

Encefalopatia causada pela amônia

Os mecanismos envolvidos na toxicidade da amônia – em particular a encefalopatia – não são bem definidos. Está claro, no entanto, que quando sua concentração se eleva no sangue e em outros fluídos biológicos, a amônia se difunde para dentro das células e atravessa a barreira hematoencefálica. O aumento de amônia causa um aumento na síntese de glutamato a partir de α-cetoglutarato e aumenta a síntese de glutamina. Embora essa seja uma reação de desintoxicação normal das células, quando as concentrações de amônia estão significantemente aumentadas, o fornecimento de α-cetoglutarato nas células do SNC pode se esgotar, resultando na inibição do ciclo do TCA e na diminuição da produção de ATP. Pode haver mecanismos adicionais responsáveis pelo comportamento estranho observado em indivíduos com altas concentrações de amônia no sangue. Tanto o glutamato, o principal neurotransmissor inibitório, ou seu derivado, o ácido γ-aminobutírico (GABA), podem também contribuir para os efeitos sobre o SNC.

DOENÇA DE PARKINSON

Um homem até então saudável, com 60 anos de idade, reparou um tremor ocasional em seu braço esquerdo quando estava relaxado assistindo à televisão. Ele também notou câimbras musculares ocasionais em sua perna esquerda, e sua esposa observou que ele apresentava ocasionalmente um olhar fixo como se estivesse em transe. Um exame físico completo e uma consulta com o neurologista confirmaram o diagnóstico de doença de Parkinson. Foi prescrita uma medicação contendo $_L$-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA) e um inibidor da monoamina oxidase (MAOI). A $_L$-DOPA é um precursor do neurotransmissor dopamina, enquanto a monoamina oxidase é a enzima responsável pela desaminação oxidativa e degradação da dopamina. Seus sintomas melhoraram imediatamente, mas gradualmente ele apresentou efeitos colaterais significativos decorrentes da medicação, especialmente a ocorrência de movimentos involuntários.

Comentário. A doença de Parkinson é causada pela morte das células produtoras de dopamina na

substância nigra e no *locus* cerúleo. Embora a medicação possa reduzir acentuadamente os sintomas, a doença é progressiva e pode resultar em uma incapacidade severa. Os agonistas dopaminérgicos normalmente possuem efeitos colaterais e também possuem um efeito limitado sobre o tremor, tanto que outros tratamentos, como a estimulação cerebral profunda ou a ablação, são utilizados em casos selecionados. A monoamina oxidase também está envolvida na desaminação de outras aminas no cérebro, tanto que as MAOIs têm efeitos colaterais indesejados. O transplante de tecido fetal dopaminérgico é atualmente um tratamento experimental controverso (Cap. 42).

HIPERAMONEMIA HEREDITÁRIA

Um bebê do sexo feminino com 5 meses de idade e aparentemente saudável foi levado ao consultório de um pediatra por sua mãe, com a queixa de episódios periódicos de vômito e com dificuldade de ganhar peso. A mãe também reportou que a criança podia oscilar entre períodos de irritabilidade e letargia. Um exame e os resultados de laboratório subsequentes revelaram um eletroencefalograma anormal, um aumento acentuado da concentração de amônia no plasma (323 mmol/L, 550 mg/dL; a variação normal é de 15-88 mmol/L, 25-150 mg/dL) e concentrações acima do normal de glutamina, porém baixas concentrações de citrulina. O orotato, um nucleotídeo precursor da pirimidina, foi encontrado na urina.

Comentário. O bebê foi admitido no hospital e tratado com fenilacetato e benzoato intravenosos, juntamente com arginina. O benzoato e o fenilacetato são metabolizados e conjugados à glicina e ao glutamato, os quais são excretados, com o seu conteúdo nitrogenado, na urina; a arginina estimula a atividade do ciclo da ureia residual. O bebê melhorou rapidamente e recebeu alta do hospital com uma dieta pobre em proteínas e suplementação de arginina. Uma biópsia subsequente do fígado da paciente indicou que a atividade hepática da ornitina transcarbamoilase estava em cerca de 10% do normal.

TRIAGEM DOS DEFEITOS METABÓLICOS DOS AMINOÁCIDOS EM RECÉM-NASCIDOS

Atualmente, na maioria dos países desenvolvidos é colhida rotineiramente uma gota do sangue de bebês recém-nascidos, em um papel filtro e, então, é testada para uma série de compostos que são marcadores de doenças metabólicas hereditárias. O número de marcadores testados pode variar de estado para estado nos EUA, mas geralmente varia entre 10 e 30. Devido à necessidade de uma triagem rápida, do tamanho pequeno da amostra e da redução do custo, a metodologia mais antiga está sendo rapidamente substituída por uma tecnologia que utiliza cromatografia líquida ou gasosa com espectrometria de massa para medir o nível de múltiplos marcadores simultaneamente. A velocidade e a alta capacidade de rendimento dessa tecnologia permitem a triagem rápida de 20 ou mais marcadores, a partir de gotas de sangue secas, e a identificação dos bebês que são vítimas potenciais desses erros inatos do metabolismo. Essa tecnologia também é aplicada para analisar amostras de urina.

Regulação do ciclo da ureia

O ciclo da ureia é regulado em parte pelo controle da concentração de *N*-acetilglutamato, o ativador alostérico essencial da CPS I. A arginina é um ativador alostérico de *N*-acetilglutamato sintase e é também uma fonte de ornitina (via arginase) para o ciclo da ureia. As concentrações das enzimas do ciclo da ureia também aumentam ou diminuem em resposta a uma dieta rica ou pobre em proteínas. A síntese e excreção da ureia estão diminuídas e a excreção de NH_4^+ é aumentada durante a acidose, como um mecanismo para excretar prótons pela urina. Por último, deve ser notado que durante o jejum a proteína é degradada para liberar os aminoácidos que são utilizados na gliconeogênese. O aumento da degradação de proteína durante o jejum resulta no aumento da síntese e excreção da ureia, um mecanismo para eliminar o nitrogênio liberado.

Defeitos em qualquer uma das enzimas do ciclo da ureia têm sérias consequências. Bebês que nascem com defeitos em qualquer uma das primeiras quatro enzimas dessa via podem parecer normais ao nascimento, porém rapidamente se tornam letárgicos, perdem a temperatura corporal e podem ter dificuldades para respirar. As concentrações sanguíneas de amônia aumentam rapidamente, seguidas pelo edema cerebral. Os sintomas são mais severos quando as primeiras etapas do ciclo são afetadas. No entanto, um defeito em qualquer uma das enzimas dessa via é um problema sério e pode causar a hiperamonemia e levar rapidamente a um edema no SNC, coma e morte. A ornitina transcarbamoilase é o mais comum desses defeitos no ciclo da ureia e exibe uma herança paterna ligada ao X. O restante dos defeitos conhecidos associados ao ciclo da ureia são autossômicos recessivos. Uma deficiência na arginase, a última enzima do ciclo, produz sintomas menos severos, mas apesar disso é caracterizada por concentrações aumentadas de arginina no sangue e ao menos um aumento moderado de amônia no sangue. A hemodiálise deve ser usada em indivíduos com altas concentrações de amônia no sangue, frequentemente seguida pela administração intravenosa de benzoato de sódio e fenilactato. Esses compostos se conjugam à glicina e à glutamina, respectivamente, para formar adutos solúveis em água, transformando a amônia em uma forma atóxica, que pode ser excretada na urina.

O conceito do balanço nitrogenado

Por não existir uma forma significativa de armazenamento de nitrogênio ou de compostos aminados nos humanos, o metabolismo do nitrogênio é muito dinâmico. Um balanço cuidadoso é mantido entre a ingestão e a secreção de nitrogênio. Em uma dieta saudável e regular, o conteúdo proteico excede as quantidades necessárias para o suprimento de aminoácidos essenciais e não essenciais para a síntese de proteínas, e a quantidade de nitrogênio excretada é aproximadamente igual à que foi consumida. Desse modo, um adulto saudável poderia dizer que está em "balanço nitrogenado". Quando existe a necessidade de aumentar a síntese proteica, como ocorre na recuperação de um trauma ou em uma criança em fase de crescimento rápido, a quantidade de nitrogênio excretada é menor do que a consumida na dieta e o indivíduo está em "balanço nitrogenado positivo". O inverso é verdadeiro na desnutrição proteica: devido à necessidade de sintetizar as proteínas corporais essenciais, outras proteínas, como as proteínas musculares ou a hemoglobina, são degradadas e é perdido mais nitrogênio do que é consumido na dieta. Esse indivíduo está em "balanço nitrogenado negativo". O jejum, a inanição e o diabetes mal controlado também são caracterizados pelo equilíbrio negativo de nitrogênio, uma vez que a proteína corporal é degradada em aminoácidos e seus esqueletos de carbonos são utilizados na gliconeogênese. O conceito de balanço nitrogenado é clinicamente importante porque nos lembra o *turnover* contínuo de aminoácidos e proteínas no corpo (Cap. 22).

METABOLISMO DOS ESQUELETOS DE CARBONO DOS AMINOÁCIDOS

O metabolismo dos aminoácidos está inter-relacionado com o metabolismo dos carboidratos e lipídeos

Quando se examina o metabolismo dos esqueletos de carbono dos 20 aminoácidos comuns, existe uma óbvia inter-relação com o metabolismo dos carboidratos e lipídeos. Na prática, todos os carbonos podem ser convertidos em intermediários da via glicolítica, do ciclo do TCA ou do metabolismo dos lipídeos. A primeira etapa desse processo é a transferência de um grupo α-amino através da transaminação para o α-cetoglutarato ou oxalacetato, fornecendo glutamato e aspartato, as fontes dos átomos de nitrogênio para o ciclo da ureia (Fig. 19.9). A única exceção a essa regra é a lisina, que não sofre transaminação. Embora os detalhes das vias variem para os diversos aminoácidos, a regra geral é de que existe a perda do grupo amino, seguida ou pelo metabolismo direto em uma via central (glicólise, ciclo do TCA ou metabolismo dos corpos cetônicos), ou por uma ou mais conversões intermediárias a fim de produzir um metabólito para uma das vias centrais. Exemplos de aminoácidos que seguem o primeiro esquema incluem a alanina, o glutamato e o aspartato, que produzem piruvato, α-cetoglutarato e oxalacetato, respectivamente. Os aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, valina e isoleucina, e os aminoácidos aromáticos, tirosina, triptofano e fenilalanina, são exemplos do último esquema e de vias mais complexas.

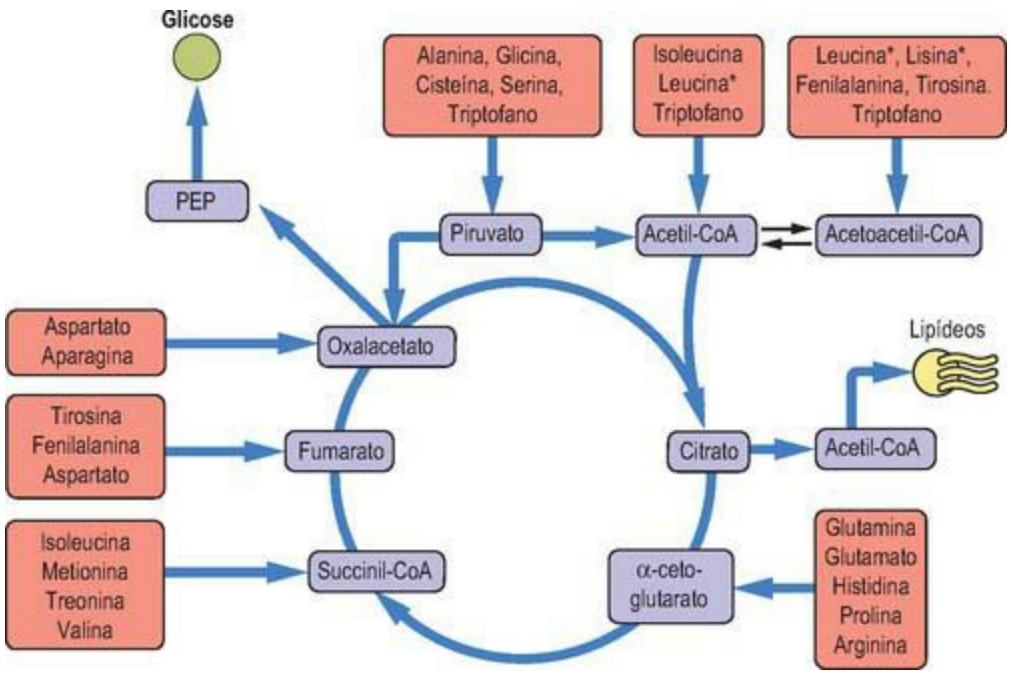


Fig. 19.9 Metabolismo de aminoácido e vias metabólicas centrais. Esta figura resume as interações entre o metabolismo de aminoácido e as vias metabólicas centrais. *Os aminoácidos marcados com um asterisco são cetogênicos somente. PEP, fosfoenolpiruvato.

Os aminoácidos podem ser glicogênicos ou cetogênicos

Dependendo do ponto no qual os carbonos de um aminoácido entram no metabolismo central, esse aminoácido pode ser considerado glicogênico ou cetogênico, isto é, possui a capacidade de

aumentar as concentrações tanto de glicose como de corpos cetônicos, respectivamente, quando dados a um animal. Aqueles aminoácidos que fornecem carbonos para o ciclo do TCA ao nível do α-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato ou oxalacetato, e aqueles que produzem piruvato podem aumentar a síntese líquida de glicose via gliconeogênese e são, portanto, designados glicogênicos. Aqueles aminoácidos que fornecem carbonos para o metabolismo central ao nível da acetil-CoA ou acetoacetil-CoA são considerados cetogênicos. Devido à natureza do ciclo do TCA, nenhum fluxo líquido de carbono pode ocorrer entre o acetato ou seu equivalente para a glicose via gliconeogênese (Cap. 13).



HOMOCISTINÚRIA

Um homem de 21 anos de idade foi admitido no hospital após um episódio de perda da fala e fraqueza severa no seu lado direito. O diagnóstico de acidente vascular cerebral isquêmico foi realizado e o paciente foi tratado com terapia anticoagulante e melhorou. Os resultados laboratoriais indicaram níveis substancialmente elevados de homocisteína no sangue. O paciente teve uma recuperação significativa e teve alta com uma dieta modificada, juntamente com suplementos de vitamina B_6, ácido fólico e vitamina B_{12}.

Comentário. A homocistinúria é uma condição autossômica recessiva relativamente rara (1 em 200.000 nascimentos) que resulta em uma variedade de sintomas, incluindo retardamento mental, problemas de visão, acidentes vasculares cerebrais trombóticos e doença na artéria coronária em idade precoce. Essa condição é causada pela falta da enzima que catalisa a transferência do enxofre da homocisteína para a serina através da formação de um intermediário de cistationina. Alguns desses pacientes respondem à suplementação vitamínica. Níveis moderadamente elevados de homocisteína no plasma estão implicados ao desenvolvimento da doença cardiovascular e episódios de isquemia cerebrovascular (acidente vascular cerebral). Estudos transversais e retrospectivos sugerem que mesmo níveis moderadamente elevados de homocisteína podem estar correlacionados ao aumento da incidência de doença cardíaca e acidente vascular cerebral, porém ainda não sabe se a diminuição dos níveis de homocisteína irá reduzir o desenvolvimento dessas patologias graves.

Muitos aminoácidos, especialmente aqueles com estruturas mais complexas ou aromáticas, podem produzir tanto fragmentos glicogênicos quanto cetogênicos (Fig. 19.9). Apenas os aminoácidos leucina e lisina são considerados como sendo exclusivamente cetogênicos e, devido ao seu metabolismo complexo e à incapacidade de sofrer transaminação, alguns autores não consideram a lisina como sendo exclusivamente cetogênica. Essas classificações podem ser resumidas como segue:

- **Aminoácidos glicogênicos:** alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, cistina, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, metionina, prolina, serina, valina;

- **Aminoácidos cetogênicos:** leucina, lisina;

- **Aminoácidos tanto cetogênicos quanto glicogênicos:** isoleucina, fenilalanina, treonina, triptofano, tirosina.

Metabolismo dos esqueletos de carbono de aminoácidos selecionados

Alanina, aspartato e glutamato são exemplos de aminoácidos glicogênicos. Em cada caso, através de um dos dois, transaminação ou desaminação oxidativa, o α-cetoácido resultante é um precursor direto do oxalacetato para as vias metabólicas centrais. O oxalacetato pode então ser convertido em PEP, e subsequentemente em glicose, via gliconeogênese. Outros aminoácidos glicogênicos alcançam o ciclo do TCA ou intermediários metabólicos relacionados através de várias etapas, após a remoção do grupo amino (Fig. 19.9).

A leucina é um exemplo de aminoácido cetogênico. Seu catabolismo começa com a transaminação para produzir 2-cetoisocaproato. O metabolismo de 2-cetoisocaproato requer a descarboxilação oxidativa por um complexo desidrogenase para produzir isovaleril-CoA. O metabolismo posterior da isovaleril-CoA leva à formação de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, um precursor tanto da acetil-CoA quanto dos corpos cetônicos. O metabolismo da leucina e de outros aminoácidos de cadeia ramificada está resumido na Figura 19.10. A propionil-CoA derivada da degradação do aminoácido ou do metabolismo do ácido graxo de cadeia ímpar é convertida em succinil-CoA (Fig. 15.5).

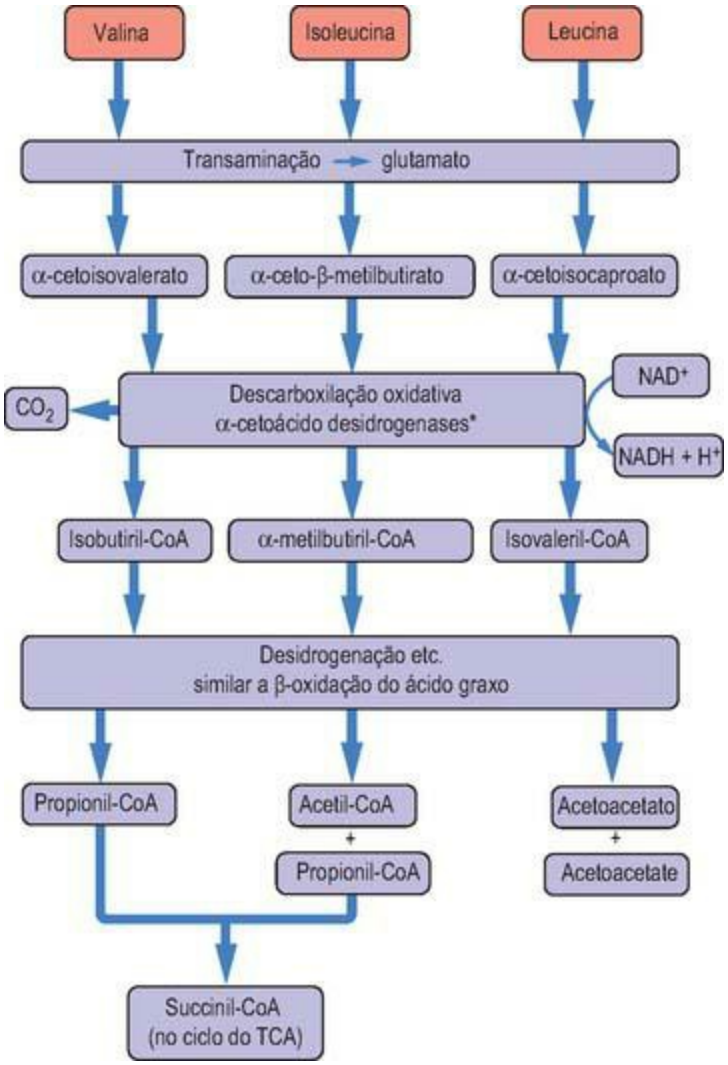


Fig. 19.10 Degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada. O metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada produz acetil-CoA e acetoacetato. No caso da valina e da isoleucina, o propionil-CoA é produzido e metabolizado, em duas etapas, em succinil-CoA (Fig. 15.5). *As desidrogenases de aminoácidos de cadeia ramificada são estruturalmente relacionadas à piruvato desidrogenase e à

α-cetoglutarato desidrogenase, e utilizam os cofatores pirofosfato de tiamina, ácido lipoico, flavina adenina dinucleotídeo, NAD^+ e CoA.

O triptofano é um bom exemplo de aminoácido que produz tanto precursores glicogênicos quanto cetogênicos. Após a clivagem do seu anel heterocíclico e um conjunto complexo de reações, o núcleo da estrutura do aminoácido é liberado como alanina (um precursor glicogênico), enquanto o restante dos carbonos é, ao final, convertido em glutaril-CoA (um precursor cetogênico). A Figura 19.11 resume os pontos-chave do catabolismo dos aminoácidos aromáticos.

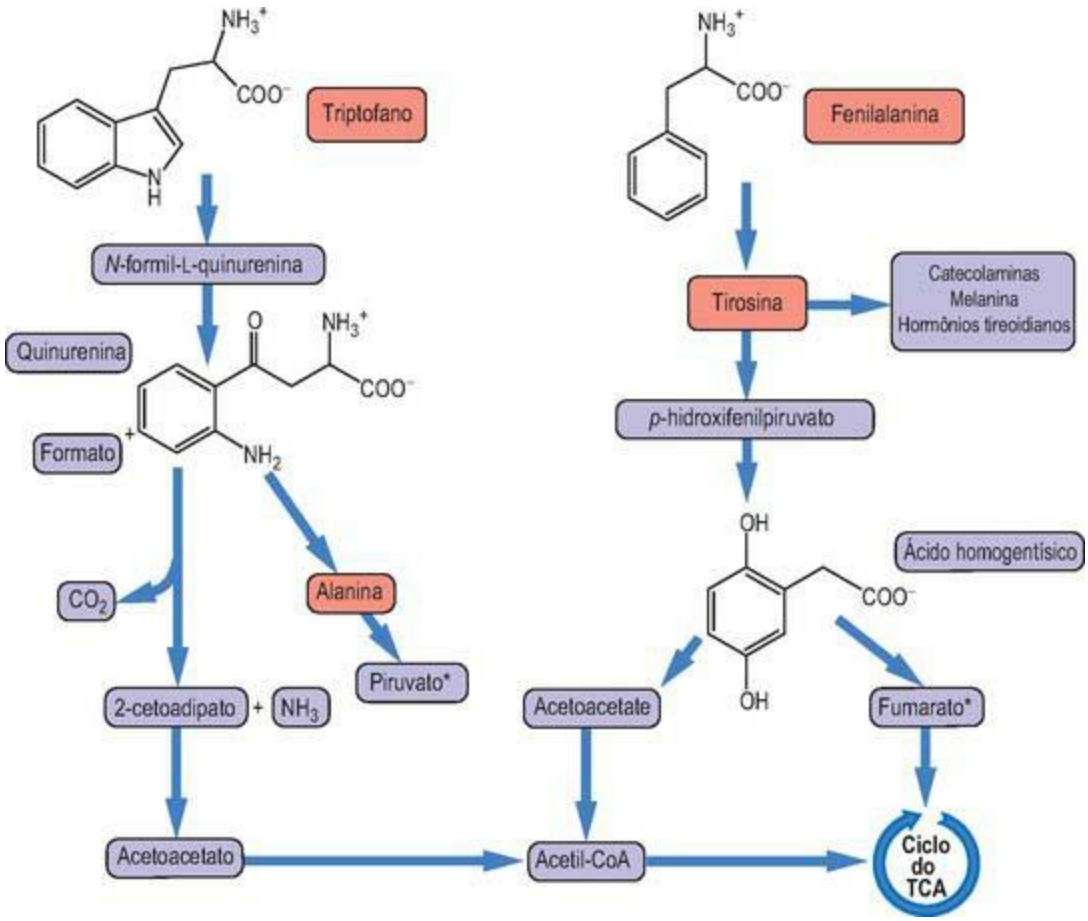


Fig. 19.11 Catabolismo dos aminoácidos aromáticos. Esta figura resume o catabolismo dos aminoácidos aromáticos, ilustrando as vias que conduzem aos precursores cetogênicos e glicogênicos derivados tanto da tirosina quanto do triptofano. *Tanto o piruvato quanto o fumarato podem levar à síntese líquida de glicose. Eles constituem as porções gliconeogênicas do metabolismo desses aminoácidos.

BIOSSÍNTESE DE AMINOÁCIDOS

A evolução deixou nossas espécies incapazes de sintetizar quase metade dos aminoácidos requeridos na síntese de proteínas e outras biomoléculas

Os humanos utilizam 20 aminoácidos para formarem os peptídios e proteínas que são essenciais para as muitas funções de suas células. A biossíntese dos aminoácidos envolve a síntese dos esqueletos de carbonos para os α-cetoácidos correspondentes, seguida pela adição do grupo amino via transaminação. No entanto, os humanos são capazes de realizar a biossíntese dos esqueletos de carbonos de apenas cerca de metade desses α-cetoácidos. Os aminoácidos que nós não podemos sintetizar são conhecidos como aminoácidos essenciais e são requeridos na dieta. Embora quase todos os aminoácidos possam ser classificados claramente como essenciais ou não essenciais, alguns necessitam de uma qualificação adicional. Por exemplo, apesar da cisteína não ser geralmente considerada como um aminoácido essencial, porque ela pode ser derivada de um aminoácido não essencial, a serina, o seu enxofre tem que vir de um aminoácido essencial ou necessário, a metionina. Igualmente, o aminoácido tirosina não é requerido na dieta, mas tem que ser derivado do aminoácido essencial, a fenilalanina. Essa relação entre fenilalanina e tirosina será discutida posteriormente quando considerarmos a doença hereditária fenilcetonúria (PKU). As Tabelas 19.5 e 19.6 listam os aminoácidos essenciais e não essenciais e a fonte do esqueleto de carbono no caso dos que não são requeridos na dieta.

Tabela 19.5 Origens dos aminoácidos não essenciais.

Origens dos aminoácidos não essenciais	
Aminoácido	**Fonte no metabolismo etc.**
alanina	a partir do piruvato via

ácido aspártico, asparagina, arginina, ácido glutâmico, glutamina, prolina	transaminação a partir de intermediáries do ciclo do ácido cítrico
serina	a partir do 3-fosfoglicerato (glicólise)
glicina	a partir da serina
cisteína*	a partir da serina; necessita do enxofre derivado da metionina
tirosina*	derivado a partir da fenilalanina via hidroxilação

* *Estes são exemplos de aminoácidos não essenciais que dependem de quantidades adequadas de urn aminoácido essencial.*

Tabela 19.6 Aminoácidos essenciais da dieta.

Aminoácidos essenciais da dieta		
Mnemônica	**Aminoácido***	**Notas ou comentários**
P	fenilalanina	necessária na dieta também como precursor da tirosina
V	valina	um dos três aminoácidos de cadeia ramificada
T	treonina	metabolizada como um aminoácido de cadeia ramificada
T	triptofano	sua cadeia lateral heterocíclica complexa não pode ser sintetizada nos humanos
I	isoleucina	um dos três aminoácidos de cadeia ramificada
M	metionina	fornece o enxofre para a cisteína e participa como urn doador de metil no metabolismo; a homocisteína é reciclada
H	histidina	sua cadeia lateral heterocíclica não pode ser sintetizada nos humanos
A	arginina	enquanto a arginina pode ser derivada a partir da ornitina, no ciclo da ureia, em quantidades suficientes para suprir as necessidades dos adultos, os animais em crescimento necessitam dela na dieta
L	leucina	urn aminoácido puramente cetogênico
L	lisina	não sofre transaminação direta

* *A regra mnemônica PVT TIM HALL é útil para recordar os nomes dos aminoácidos essenciais.*

Os aminoácidos são precursores de muitos compostos essenciais

Além da sua função como blocos formadores de peptídios e proteínas, os aminoácidos são precursores essenciais de diversos neurotransmissores, hormônios, mediadores inflamatórios e de moléculas transportadoras e efetoras (Tabela 19.7). Alguns dos aminoácidos podem ser utilizados diretamente como neurotransmissores, por exemplo, a glicina, o aspartato e o glutamato, enquanto outros podem ser convertidos em neurotransmissores ou hormônios através de alguma modificação.

A tirosina é notável, na medida em que serve como uma precursora de diversos neurotransmissores, as catecolaminas e os hormônios tireoidianos.

Tabela 19.7 Exemplos de aminoácidos como moléculas efetoras ou precursores.

Exemplos de aminoácidos como moléculas efetoras ou precursores	
Aminoaciclo	**Molécula efetora ou grupo prostético**
arginina	precursor imediato da ureia, precursor de óxido nítrico
aspartato	aspartato, um neurotransmissor excitatório
glicina	glicina, um neurotransmissor inibitório; precursor do heme
glutamato	glutamato, neurotransmissor excitatório; precursor do áddo γ-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor inibitório
histidina	precursor da histamina, um mediador da inflamação e urn neurotransmissor
triptofano	precursor da serotonina, urn potente estimulador da contração do músculo liso; precursor da melatonina, urn regulador do ritmo circadiano
tirosina	precursor dos hormônios e neurotransmissores, catecolaminas, dopamina, epinefrina e norepinefrina, tiroxina

DOENÇAS HEREDITÁRIAS DO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

Além das deficiências no ciclo da ureia, os defeitos no metabolismo dos esqueletos de carbono de vários aminoácidos estão entre os primeiros estados patológicos a serem associados aos padrões de hereditariedade simples. Estas observações deram origem ao conceito das bases genéticas dos estados patológicos metabólicos hereditários, também conhecidos como erros inatos do metabolismo. Garrod considerou uma diversidade de estados patológicos que pareciam ser herdados em um padrão Mendeliano, e propôs uma correlação entre essas anormalidades e genes específicos, na qual o estado patológico poderia ser tanto dominante quanto recessivo. Dezenas de erros inatos do metabolismo foram descritos até agora e o defeito molecular foi descrito para muitos deles. Três erros inatos clássicos do metabolismo serão discutidos em detalhes adiante.

Fenilcetonúria (PKU)

A forma comum de PKU resulta de uma deficiência na enzima fenilalanina hidroxilase. A hidroxilação da fenilalanina é uma etapa necessária em ambas, na degradação do esqueleto de carbono desse aminoácido e na síntese de tirosina (Fig. 19.12). Quando não é tratado, esse defeito metabólico leva à excreção urinária excessiva de fenilpiruvato e fenilactato e retardo mental severo. Além disso, indivíduos com PKU tendem a ter pouca pigmentação na pele, marcha, postura em pé e sentada incomuns e uma elevada frequência de epilepsia. Nos EUA, esse defeito autossômico recessivo ocorre em cerca de 1 em cada 30.000 nascidos vivos. Devido à sua frequência e a capacidade de prevenir as consequências mais sérias do defeito através de uma dieta pobre em fenilalanina, os recém-nascidos na maioria dos países desenvolvidos são testados rotineiramente quanto às concentrações sanguíneas de fenilalanina. Felizmente, com a detecção precoce e a utilização de uma dieta restrita de fenilalanina, porém suplementada com tirosina, a maior parte do retardo mental pode ser evitada. As mães que são homozigotas para esse defeito têm uma probabilidade muito elevada de gerarem filhos com defeitos congênitos e retardo mental a menos que suas concentrações sanguíneas de fenilalanina possam ser controladas por meio da dieta. O feto em desenvolvimento é muito sensível aos efeitos tóxicos das altas concentrações de fenilalanina e fenilcetonas relacionadas. Nem todas as hiperfenilalaninemias são causadas por um defeito na fenilalanina hidroxilase. Em alguns casos, ocorre um defeito na biossíntese ou redução de um cofator necessário, a tetra-hidrobiopterina.

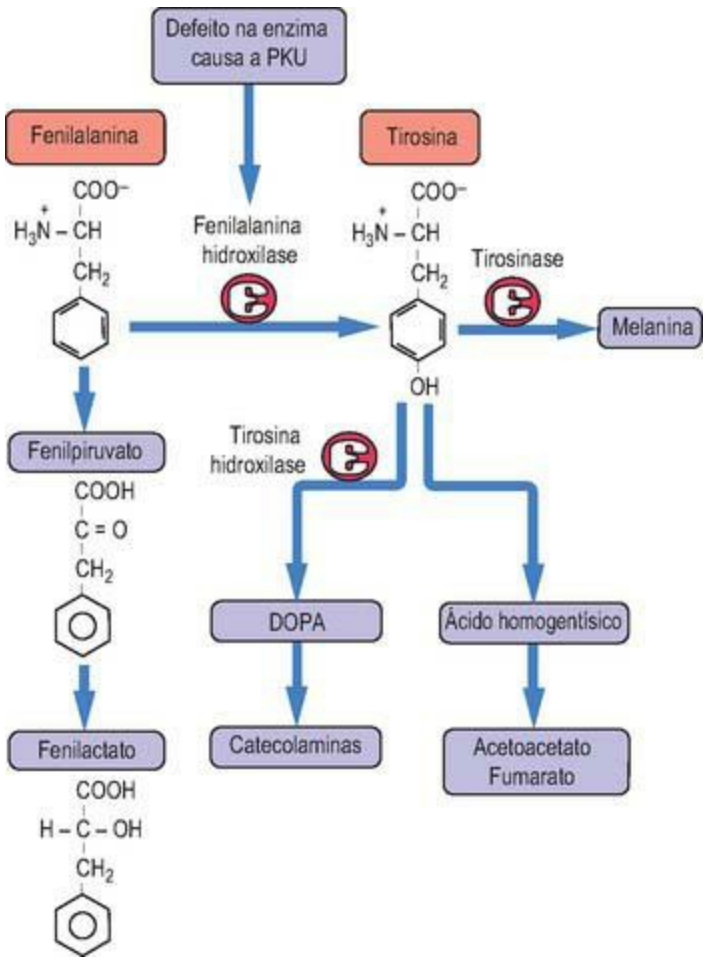


Fig. 19.12 Degradação da fenilalanina. A fim de entrar no metabolismo normal, a fenilalanina tem de ser hidroxilada pela enzima

fenilalanina hidroxilase. Um defeito nessa enzima leva à fenilcetonúria (PKU). A tirosina é um precursor da acetil-CoA e do fumarato, dos hormônios catecolamina, do neurotransmissor dopamina e do pigmento melanina. DOPA, di-hidroxifenilalanina.

ALBINISMO

Observou-se que um bebê nascido no tempo certo, filho de mãe e pai normais e saudáveis, apresentava uma redução acentuada de pigmentação. O bebê, que fora isso aparentava ser normal, tinha olhos azuis e um cabelo louro muito claro, quase branco. Essa ausência de pigmentação foi confirmada como albinismo clássico com base na história familiar e no estabelecimento da ausência da enzima tirosinase, que é responsável pela hidroxilação em duas etapas da tirosina em di-hidroxifenilalanina (DOPA) e a subsequente oxidação adicional em quinona, um precursor da melanina nos melanócitos (Cap. 42).

Comentário. Uma enzima produtora de DOPA separada, a tirosina hidroxilase, está envolvida na biossíntese do neurotransmissor catecolamina, assim, os albinos não parecem ter déficits neurológicos. Como resultado da sua ausência de pigmentação, no entanto, eles são muito sensíveis ao dano causado pela luz solar e têm de tomar precauções adicionais contra a radiação ultravioleta solar. Os albinos têm visão normal, apesar da ausência de pigmentação, mas são geralmente muito sensíveis à luz brilhante.

FENILALANINA HIDROXILASE

A hidroxilação da fenilalanina é uma etapa crítica no seu catabolismo e na sua conversão em tirosina, hormônio tireoidiano e hormônios catecolaminas. A fenilalanina hidroxilase é um exemplo de oxidase de função mista, uma enzima que utiliza um cofator reduzido e o oxigênio molecular para realizar uma reação de hidroxilação. O cofator é a tetra-hidrobiopterina, que é oxidada em di-hidrobiopterina durante a reação de hidroxilação. Os hidrogênios e o oxigênio residuais são liberados como água. A fim de que essa reação continue, a di-hidrobiopterina tem de ser reduzida à sua forma tetra-hidro e necessita de uma segunda enzima, di-hidrobiopterina redutase, que usa NADH para permitir a redução. A hidroxilação posterior da tirosina, na via que leva às catecolaminas, requer uma oxidase de função mista similar, tirosina hidroxilase. A fenilcetonúria pode se desenvolver como resultado de mutações tanto na fenilalanina hidroxilase quanto nas enzimas envolvidas na síntese ou reciclagem da tetra-hidrobiopterina.

SELENOCISTEíNA

Além dos 20 aminoácidos comuns encontrados nas proteínas, um 21° aminoácido foi descoberto e demonstrou ser um aminoácido de sítio ativo em diversas enzimas, incluindo a enzima antioxidante glutationa peroxidase (Cap. 37) e 5′-deiodinases (Fig. 39.8). A selenocisteína é derivada da serina e tem propriedades químicas únicas; a substituição da selenocisteína pela cisteína pode ter um efeito inibitório pronunciado na atividade enzimática. É devido à necessidade de selenocisteína que

pequenas quantidades de selênio são requeridas na dieta.

Alcaptonúria (doença da urina preta)

Um segundo defeito hereditário na via da fenilalanina-tirosina envolve uma deficiência na enzima que catalisa a oxidação do ácido homogentísico, um intermediário no catabolismo da tirosina e da fenilalanina. Nessa patologia, que ocorre em 1 em 1.000.000 de nascidos vivos, o ácido homogentísico se acumula e é excretado na urina. Esse composto oxida com o tempo ou no tratamento com substâncias alcalinas, e dá à urina uma cor escura. Por fim, indivíduos com alcaptonúria sofrem com a deposição do pigmento escuro (cor de ocre) no tecido cartilaginoso, com subsequente dano tecidual, incluindo artrite severa; o aparecimento desses sintomas ocorre geralmente na terceira ou quarta década de vida. Essa doença autossômica recessiva foi a primeira de muitas que Garrod considerou ao propor sua hipótese inicial para os erros inatos do metabolismo. Apesar de a alcaptonúria ser relativamente benigna comparada à PKU, há poucos tratamentos disponíveis, além do alívio sintomático.

Doença da urina em xarope de bordo (MSUD)

O metabolismo normal dos aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, isoleucina e valina envolve a perda do grupo α-amina, seguida pela descarboxilação oxidativa do α-cetoácido resultante. Essa etapa da descarboxilação é catalisada pela cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada, um complexo multienzimático associado à membrana interna da mitocôndria. Em aproximadamente 1 em 300.000 nascidos vivos, um defeito nessa enzima leva ao acúmulo do cetoácido correspondente a esse aminoácido de cadeia ramificada no sangue e, assim, à cetoacidúria de cadeia ramificada. Quando não é tratada ou controlada, essa patologia pode levar tanto a um retardamento mental quanto físico do recém-nascido e ao odor característico de xarope de bordo na urina. Esse defeito pode ser parcialmente controlado com uma dieta modificada ou pobre em proteínas, mas não em todos os casos. Em alguns casos, a suplementação com altas doses de pirofosfato de tiamina, um cofator para este complexo enzimático, tem sido útil.



CISTINÚRIA

Um homem de 21 anos de idade veio para a sala de emergência com uma dor intensa em seu lado direito e nas costas. Uma investigação subsequente indicou um cálculo renal e concentrações elevadas de cistina, arginina e lisina na urina. Esse paciente apresentava os sintomas característicos da cistinúria.

Comentário. A cistinúria é um distúrbio autossômico recessivo da absorção intestinal e da reabsorção tubular proximal dos aminoácidos dibásicos; ela não resulta de um defeito no metabolismo da cisteína *per se*. Devido à deficiência no transporte, a cisteína, que é normalmente reabsorvida no túbulo renal proximal, permanece na urina. A cisteína se oxida espontaneamente à sua forma de dissulfeto, a cistina. A cistina é relativamente insolúvel e tende a se precipitar no trato urinário, formando os cálculos renais. A patologia é geralmente tratada através da restrição do consumo de metionina na dieta (um precursor biossintético da cisteína) e da estimulação do consumo elevado de líquidos para manter a urina diluída, e, mais recentemente, com várias drogas que podem converter a cisteína urinária em um composto mais solúvel que não se precipita.

Resumo

Neste capítulo, vimos que o metabolismo dos aminoácidos está integralmente relacionado ao objetivo final do metabolismo. O catabolismo dos aminoácidos começa, geralmente, com a remoção do grupo α-amino, que é transferido para o α-cetoglutarato e o oxalacetato e por último é excretado sob a forma de ureia. Os esqueletos de carbono resultantes são convertidos em intermediários que entram no metabolismo central em vários pontos. Pelo fato dos esqueletos de carbono correspondentes aos vários aminoácidos poderem ser derivados ou alimentarem a via glicolítica, o ciclo do TCA, a biossíntese de ácidos graxos e a gliconeogênese, o metabolismo do aminoácido não deve ser considerado como uma via isolada. Embora os aminoácidos não possam ser armazenados como a glicose (glicogênio) ou os ácidos graxos (triglicerídeos), eles têm uma função importante e dinâmica, não apenas no fornecimento de blocos formadores para a síntese e *turnover* de proteínas, mas também no metabolismo energético normal, fornecendo uma fonte de carbono para a gliconeogênese, quando necessário, e uma fonte de energia, como último recurso na inanição. Além disso, os aminoácidos fornecem os precursores para a biossíntese de uma diversidade de pequenas moléculas sinalizadoras, incluindo hormônios e neurotransmissores. As consequências graves das doenças hereditárias como a fenilcetonúria e a doença da urina em xarope de bordo ilustram os efeitos do metabolismo anormal dos aminoácidos.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. A tirosina é incluída como um suplemento no planejamento da dieta para indivíduos com fenilcetonúria. Qual é o motivo para essa suplementação? Compare as abordagens terapêuticas utilizadas para o tratamento das várias formas de PKU nas quais a fenilalanina hidroxilase não está afetada.

2. Revise o motivo da utilização de levodopa, inibidores da catecol-*O*-metiltransferase e inibidores da monoamina oxidase no tratamento da doença de Parkinson.

3. Revise as vias da biossíntese dos neurotransmissores serotonina, melatonina, dopamina e as catecolaminas. Quais enzimas estão envolvidas na inativação desses compostos?

Leituras sugeridas

Cederbaum S. Phenylketonuria: an update. *Curr Opin Pediatr*. 2002;14:702-706.

Gropman AL, Summar M, Leonard JV. Neurological implications of urea cycle disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30:865-879.

Kuhara T. Noninvasive human metabolome analysis for differential diagnosis of inborn errors of metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;855:42-50.

Morris SMJr. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:87-105.

Ogier de Baulny H, Saudubray JM. Branched-chain organic acidurias. *Semin Neonatal*. 2002;7:65-74.

Pitt JJ, Eggington M, Kahler SG. Comprehensive screening of urine samples for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2002;48:1970-1980.

Saudubray JM, Nassogne MC, de Lonlay P, Touati G. Clinical approach to inherited metabolic disorders in neonates: an overview. *Semin Neonatal*. 2002;7:3-15.

Singh RH. Nutritional management of patients with urea cycle disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30:880-887.

Steiner RD, Cederbaum SD. Laboratory evaluation of urea cycle disorders. *J Pediatr*. 2001;138(Suppl 1):S21-S29.

Sites

Erros inatos no metabolismo dos aminoácidos Erros inatos no metabolismo dos aminoácidos. www.gpnotebook.co.uk/simplepage.Cfm?ID=-1811546080.

Distúrbios Distúrbios no ciclo da ureia:

- www.nucdf.org
- www.ureacycle.com

Metabolismo de nitrogênio Metabolismo de nitrogênio. http://themedicalbiochemistrypage.org/nitrogen-metabolism.html.

Doença da urina em xarope de bordo Doença da urina em xarope de bordo. www.msud-support.org/overview.htm.

Doença de Parkinson. www.enotes.com/nursing-encyclopedia/parkinson-s-disease.

Fenilcetonúria Fenilcetonúria. http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/phenylketonuria.html.

Músculo: Metabolismo Energético e Contração

J.A. Carson

J.W. Baynes

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a estrutura do músculo e sua função na produção de força mecânica, incluindo diferenças entre tipos de músculos esquelético, cardíaco e liso que estão relacionadas à s suas funções fisiológicas.

- Descrever a estrutura do sarcômero e o mecanismo da contração muscular, incluindo a composição dos filamentos espessos e finos, a base para os padrões em bandas e o modelo do deslizamento de filamentos.

- Descrever a sequência de eventos no acoplamento de excitação-contração, incluindo os papéis da despolarização de membrana, o retículo sarcoplasmático e o desencadeamento pelo cálcio.

- Identificar os sítios-chave de utilização de energia durante a contração muscular, a relação entre produção de força e utilização de substrato, o papel da creatina fosfato no músculo esquelético e o impacto do tipo de fibra de músculo esquelético na utilização de substrato e na função muscular.

- Descrever as mudanças na massa de músculo esquelético e no metabolismo em doenças como sarcopenia, síndrome metabólica e condições consuptivas.

INTRODUÇÃO

Há três tipos de músculos: esquelético, cardíaco e liso, cada um com um papel fisiológico peculiar. Sua função comum é a de conversão de energia química em energia mecânica, mas estes diferem nos seus mecanismos de iniciação da contração, velocidade no desenvolvimento de força, duração da contração e utilização de substratos. Os músculos correspondem a cerca de 40% da massa corporal total e a atividade muscular é o principal determinante da taxa metabólica total do organismo, tanto no estado basal quanto durante a atividade. Mudanças no metabolismo muscular esquelético ocorrem com a atividade física e estão diretamente relacionadas à geração de força requerida e à duração da atividade. Estes fatores também afetam a utilização relativa pelo músculo de glicose e ácidos graxos como combustíveis. Além da locomoção, o músculo esquelético é uma fonte de calor corporal, fornece aminoácidos para a gliconeogênese hepática durante o jejum e é o principal local de depósito de glicose e de triglicerídeos após uma refeição. Por conta de seu papel crítico na regulação do fluxo sistêmico de combustíveis e do metabolismo, a perda de massa muscular tem efeito importante no metabolismo geral. A idade avançada e as doenças consuptivas como a AIDS e o câncer são condições associadas à perda de massa muscular e esta perda está associada a aumentos da morbidade e da mortalidade.

O foco principal desse capítulo será o músculo esquelético, suplementado pela discussão das semelhanças e diferenças nas estruturas, funções e metabolismo dos músculos esquelético, cardíaco e liso. O capítulo começará com a discussão sobre o mecanismo da contração muscular, prosseguirá com a sinalização que inicia o processo de contração e, então, examinará o metabolismo energético fundamental para a contração.

SARCOPENIA

A sarcopenia é definida como perda da massa muscular esquelética com a idade. A sarcopenia é acelerada em humanos após a quinta década de vida e pode levar a uma fragilidade e perda da capacidade funcional. Além da perda da qualidade de vida, a perda da massa muscular esquelética também aumenta o risco de mortalidade e a morbidade. A causa da sarcopenia parece estar relacionada tanto a uma programação biológica de perda de fibras musculares como ao decréscimo da atividade física. A inervação da fibra muscular pelos neurônios motores espinhais é crítica para ambos o desenvolvimento e a manutenção do fenótipo da célula muscular madura. Os neurônios motores espinhais decrescem em número com o avanço da idade, possivelmente pelo dano oxidativo cumulativo a essas células pós-mitóticas. A diminuição do número de fibras musculares, acompanhada por um aumento no tamanho da unidade motora, diminui a habilidade motora fina. A sarcopenia foi, também, relacionada a alterações sistêmicas induzidas pela idade nos sistemas endócrino, cardiovascular e imune, cujas funções são críticas para a manutenção da massa muscular esquelética.

Comentário. A evidência científica é clara em demonstrar que a maioria dos indivíduos idosos pode aumentar a força e a massa muscular com um programa regular de exercícios de resistência. Tratamentos com fármacos também têm sido examinados para indivíduos que não podem se exercitar regularmente. Atualmente não existe tratamento para a perda de neurônios motores espinhais.

Fármacos direcionados ao músculo exibiram vários graus de sucesso, mas estão geralmente limitados pelos seus efeitos colaterais. Os tratamentos incluem intervenções endócrinas com reposição de hormônios sexuais masculinos ou femininos e terapia com hormônio do crescimento. Medicação anti-inflamatória é também empregada para permitir aos indivíduos participar em programas de atividade física. Uma das melhores medidas preventivas à sarcopenia pode ser o exercício regular para manter a massa muscular ainda durante a meia-idade.

ESTRUTURA DO MÚSCULO

O sarcômero: a unidade funcional contrátil

Uma característica comum dos miócitos cardíacos, células de músculo liso e miofibras esqueléticas é que seus citoplasmas são densamente preenchidos por proteínas contráteis. As proteínas contráteis estão dispostas em arranjos lineares de unidades de sarcômeros nas miofibras e nos miócitos cardíacos, dando a esses músculos uma aparência estriada; daí, o termo músculo estriado. As proteínas contráteis nas células de músculos lisos não são organizadas em estruturas sarcoméricas, e este tecido é descrito como músculo não estriado. A estrutura hierárquica dos músculos esqueléticos (Fig. 20.1) consiste em feixes (fascículos) de células fibrosas (miofibras) alongadas e multinucleadas. As células miofibrosas contêm feixes de miofibrilas que são, por sua vez, compostas de proteínas miofilamentosas, principalmente, miosina e actina, que formam o sarcômero (Tabela 20.1). A análise de músculos por microscopia eletrônica revela um padrão repetitivo de regiões coradas claras e escuras nas miofibrilas (Fig. 20.2). Essas regiões são conhecidas como bandas I (isotrópicas) e bandas A (anisotrópicas), respectivamente. No centro da banda I, há uma discreta linha Z de coloração mais escura, enquanto no centro da banda A observa-se uma zona H de coloração mais clara com uma linha M central. A unidade contrátil, o sarcômero, é centrada na linha M, estendendo-se de uma linha Z para a próxima. O músculo liso não apresenta uma linha Z definida.

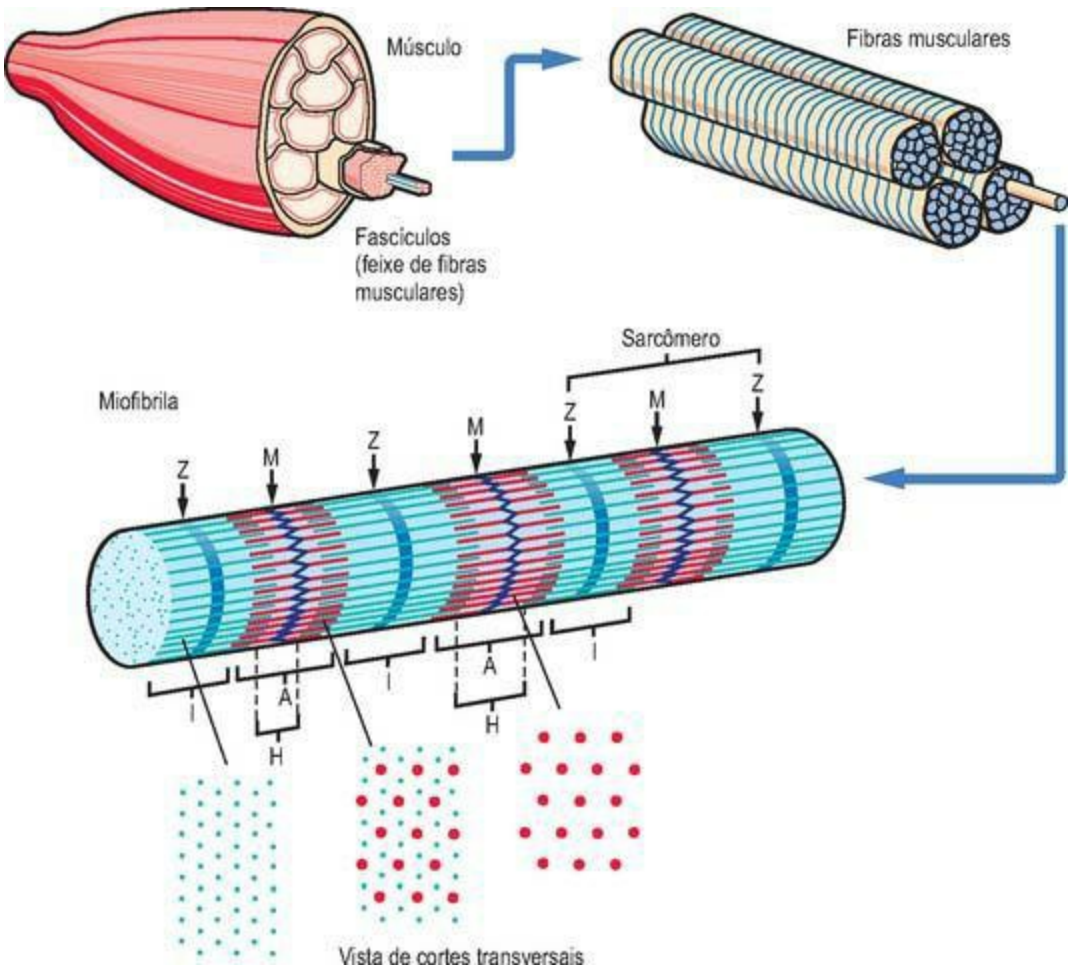


Fig. 20.1 Estrutura hierárquica do músculo. Estrutura do músculo esquelético, mostrando seu desmembramento gradual em fascículos, miofibras (células), miofibrilas e proteínas miofilamentosas. A localização da banda I (fina, filamentos de actina estendendo-se a partir da linha Z) e a banda A (grossa, filamentos de miosina estendendo-se a partir da linha M), com regiões de coloração mais escura correspondendo à sobreposição de filamentos de actina e de miosina.

Tabela 20.1 Elementos estruturais de músculos esqueléticos apresen-tados em ordem descendente de tamanhos.

Estrutura do músculo esquelético	
Unidade microscópica	fasciculo: feixe de células musculares
Unidade célula	célula miofibrosa: célula longa multinudeada
Unidade subcelular	miofibrila: composta por proteínas miofilamentosas
Unidade funcional	sarcômero: unidade contrátil, unidades repetidas de miofibrilas
Componentes miofilamentosos	proteínas: prindpalmente actina e miosina

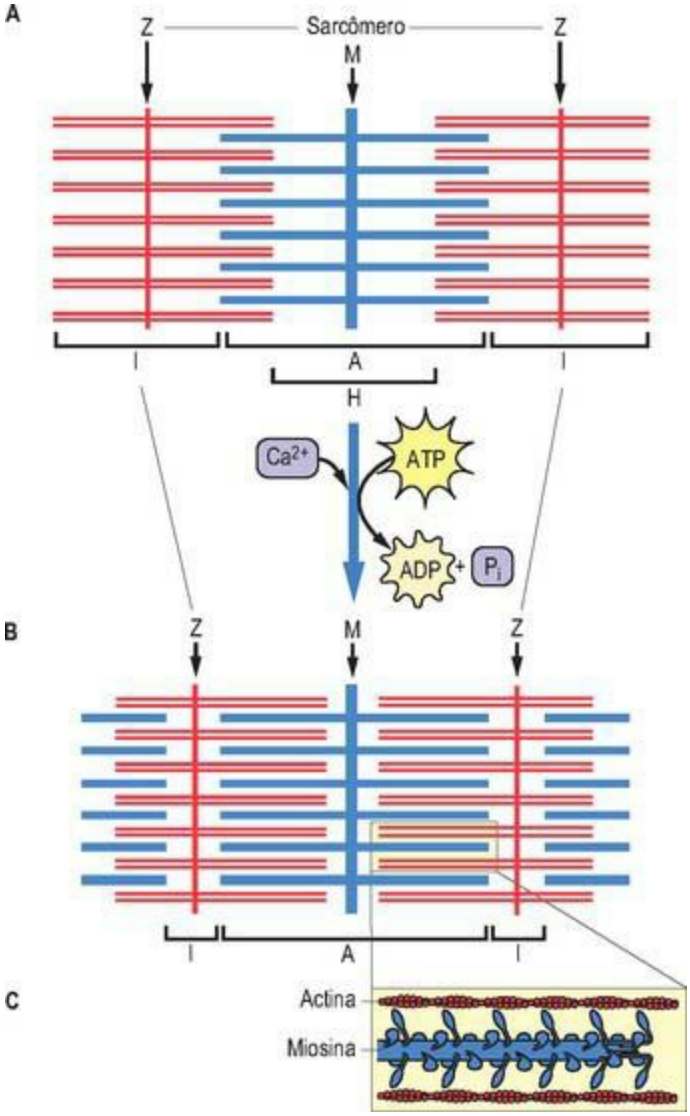


Fig. 20.2 Esquema da estrutura do sarcômero indicando a distribuição de actina e de miosina nas bandas A e I. (A) Sarcômero relaxado. (B) Sarcômero contraído. (C) Ampliação do sarcômero contraído, ilustrando a polaridade dos arranjos de moléculas de miosina. O aumento da superposição de filamentos de actina e miosina durante a contração, acompanhado por um encurtamento das zonas H e bandas I, ilustra o modelo do deslizamento de filamentos na contração muscular.

Os filamentos espessos e finos

O sarcômero pode encurtar até 70% em comprimento durante a contração muscular (Fig. 20.2). Os componentes que efetuam a contração são os filamentos espessos e finos. O filamento espesso é composto da proteína miosina e o filamento fino principalmente de actina, com proteínas associadas, tropomiosina e troponinas. Os filamentos espessos e finos se estendem em direções opostas a partir de ambos os lados das linhas M e Z, respectivamente, e se justapõem e deslizam uns nos outros durante o processo de contração (Fig. 20.2). As linhas M e Z são, de fato, plataformas para a ancoragem dos filamentos. Em músculos estriados, um aumento da superposição de filamentos espessos e finos causa o encolhimento das zonas H (somente miosina) e bandas I (somente actina). Em músculos lisos, os filamentos espessos e finos estão ancorados em estruturas denominadas corpos densos que são adicionalmente ancorados por filamentos intermediários. Embora todos os três tipos de músculos contenham proteínas actina e miosina, cada tipo de músculo expressa tipos, ou isoformas, específicos dessas proteínas; a actina e as troponinas cardíacas também diferem ligeiramente daquelas presentes no músculo esquelético.

As proteínas do sarcômero

A miosina

A miosina é uma das maiores proteínas do corpo, com uma massa molecular de aproximadamente 500 kDa, e representa mais da metade das proteínas musculares (Tabela 20.2). Ao microscópio eletrônico, a miosina aparece como uma proteína alongada com duas cabeças globulares. É o principal componente do filamento espesso no músculo. Cada molécula de miosina é composta de duas cadeias pesadas (aprox. 200 kDa) e quatro cadeias leves (aprox. 20 kDa). A cadeia pesada pode ser subdividida em regiões da cauda helicoidal e da cabeça globular. As análises estruturais por proteólise limitada indicam que há duas regiões flexíveis de dobradiça na molécula de miosina (Fig. 20.3): uma, onde a cabeça globular se liga à região helicoidal, e outra, adicional, dentro da região helicoidal. Os filamentos de miosina estão associados através de suas regiões helicoidais e se estendem para fora da linha M em direção à linha Z de cada miofibrila (Figs. 20.2 e 20.3). As regiões de dobradiça permitem que as cabeças de miosina interajam com a actina e conferem a flexibilidade necessária para as interações reversíveis e as alterações conformacionais durante a contração muscular.

Tabela 20.2 Proteínas musculares e suas funções. A actina e a mio-sina representam mais de 90% das proteínas musculares, mas várias pro-teínas associadas são necessárias para a montagem e função do complexo actomiosina.

Proteínas musculares e suas funções	
Proteína	**Função**
Miosina	atividade de ATPase dependente de Ca^{2+}
proteína-C	reunião de miosina em filamentos espessos
proteína-M	ligação de filamentos de miosina à linha M
Actina	actina G se polimeriza em filamentos de actina
tropomiosina	estabilização e propagação de alterações conformadonais da actina F
troponinas -C, -1 e -T	modulação das interações actina-miosina
actinas -α e -β	estabilização da actina F e ancoragem à linha Z
nebulina	possível papel na determinação do comprimento dos filamentos de actina F
titina	controle da tensão de repouso e comprimento do sarcômero
desmina	organização das miofibrilas nas células musculares
distrofina	reforço do citoesqueleto e da membrana plasmática da célula muscular

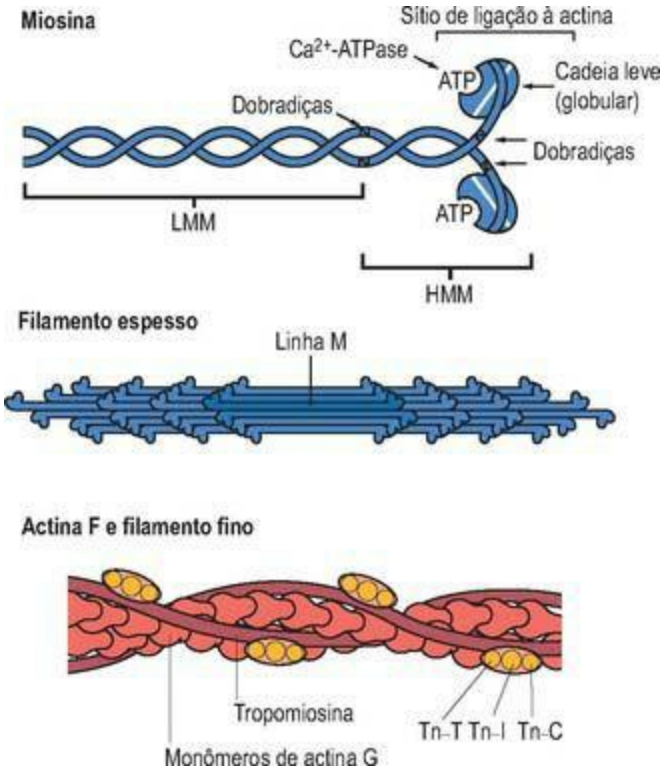


Fig. 20.3 Polimerização da miosina e da actina em filamentos espessos e finos, respectivamente. Tn-C, troponina ligante de cálcio; Tn-I, subunidade inibitória da troponina; Tn-T, troponina ligante de tropomiosina. LMM, meromiosina leve; HMM, meromiosina pesada.

Há várias características da miosina que são essenciais para a contração muscular.

- As cabeças globulares de miosina têm sítios de ligação para ATP e seus produtos de hidrólise, ADP e fosfato (Pi).

- As cabeças globulares de miosina têm atividade de ATPase dependente de Ca^{2+}.

- A miosina se liga reversivelmente à actina em função das concentrações de Ca^{2+}, ATP e ADP + Pi.

- A ligação de cálcio e a hidrólise de ATP determinam as principais alterações conformacionais da molécula de miosina e de sua interação com a actina.

- A atividade de ATPase da miosina, as interações miosina-actina e as alterações conformacionais são integradas no modelo por deslizamento de filamentos da contração muscular (adiante). Estes também explicam o desenvolvimento do *rigor mortis*. O aumento de Ca^{2+} no citoplasma muscular (sarcoplasma) e diminuição de ATP após a morte levam a uma forte ligação entre a miosina e a actina, formando um tecido muscular rígido.

A actina

A actina é composta de subunidades com 42 kDa, conhecidas como actina G (globular), que se polimerizam em uma arranjo filamentoso (actina F). Duas cadeias poliméricas se trançam para formar o microfilamento de actina F (Fig. 20.3). A actina F é o principal componente do filamento fino e interage com a miosina originando o complexo actomiosina. As cadeias de actina F se

estendem em sentidos opostos a partir da linha Z, sobrepondo-se à s cadeias de miosina que se estendem a partir da linha M. Cada filamento espesso contendo miosina é circundado por seis filamentos finos contendo actina. Cada filamento fino interage com três filamentos espessos contendo miosina (Fig. 20.1, para uma visão em seção transversa).

DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Um menino foi levado a uma clínica porque sua mãe observou que ele andava com uma marcha de pato (ou marcha anserina). A avaliação física confirmou fraqueza muscular especialmente nas pernas embora seus músculos da panturrilha estivessem grandes e firmes. Havia uma elevação de 20 vezes na atividade sérica de creatina (fosfo) quinase (CK), identificada como a isoenzima MM (músculo). A histologia revelou perda muscular, alguma necrose e aumentos do tecido conjuntivo e volume de gordura no músculo. Uma hipótese de diagnóstico de distrofia muscular de Duchenne (DMD) foi confirmada por análise imunoeletroforética (*Western blot*) mostrando a falta da proteína do citoesqueleto distrofina no músculo.

Comentário. A distrofina é uma proteína, de elevado peso molecular, do citoesqueleto que reforça a membrana plasmática da célula muscular e medeia interações com a matriz extracelular. Na sua ausência, a membrana plasmática das musculares é danificada durante o processo contrátil, levando à morte das células musculares. O gene da distrofina está localizado no cromossoma × e é, fora do comum, longo, com aproximadamente $2{,}5 \times 10^6$ pares de bases. Mutações são relativamente comuns, sendo a frequência da DMD de aproximadamente 1 em 3.500 nascimentos do sexo masculino. A DMD é uma doença miodegenerativa progressiva, geralmente levando ao confinamento à cadeira de rodas pela puberdade, com morte em torno dos 20 anos de idade por insuficiência respiratória ou cardíaca. A distrofina está completamente ausente em pacientes DMD. Uma variante da doença, conhecida como distrofia muscular de Becker, tem sintomas mais tênues e é caracterizada pela expressão de uma proteína distrofina alterada com expectativa de vida de não mais de quatro décadas. Embora não tenha atualmente tratamento, a injeção de células-satélite (células-tronco miogênicas), que expressam a proteína distrofina e são incorporadas na musculatura esquelética distrófica, tem se mostrado promissora em ensaios com animais.

Tropomiosina e troponinas

A ativação pelo cálcio da contração muscular, no músculo estriado, envolve proteínas associadas aos filamentos finos; tropomiosina e troponinas. A tropomiosina é uma proteína fibrosa que se estende ao longo das fendas da actina F, cada molécula contactando cerca de sete subunidades de actina G. A tropomiosina tem um papel na estabilização da actina F e na coordenação das alterações conformacionais entre as subunidades de actina durante a contração. Na ausência de Ca^{2+}, a tropomiosina bloqueia o sítio de ligação da miosina na actina.

Um complexo de proteínas de troponina está ligado à tropomiosina: Tn-T (ligante de tropomiosina), Tn-C (ligante de cálcio) e Tn-I (subunidade inibitória). As troponinas modulam a interação entre a actina e a miosina. A ligação do Ca^{2+} à Tn-C, uma proteína calmodulina similar,

induz mudanças na Tn-I que alteram a interação entre a tropomiosina e a actina, expondo o sítio de ligação à miosina na actina F, permitindo assim as interações actina-miosina. Para obter uma descrição do uso em diagnóstico da quantificação da troponina cardíaca, consulte o quadro da pág. 262.

O PROCESSO DE CONTRAÇÃO

A contração muscular pelo modelo do deslizamento de filamentos

O modelo de deslizamento de filamentos descreve como uma série de alterações químicas e estruturais no complexo actomiosina pode induzir o encurtamento do sarcômero. A resposta contrátil depende da formação reversível de uma "ponte", dependente de Ca^{2+} entre a cabeça da miosina e seu sítio de ligação na actina. Uma mudança conformacional nas regiões de dobradiça da miosina ocorre após a formação da ponte, fornecendo o "golpe de força" para a contração muscular (Fig. 20.4). Esta mudança de conformação, o relaxamento da forma de alta-energia da miosina, é acompanhada pela dissociação do ADP e do Pi. Após o fim do golpe, a ligação com hidrólise do ATP restabelece a conformação de alta-energia. A estabilidade do estado contraído é mantida por interações actina-miosina múltiplas e contínuas, de tal forma que o deslizamento seja minimizado até que o cálcio seja removido do sarcoplasma, permitindo a dissociação do complexo actomiosina e o relaxamento muscular.

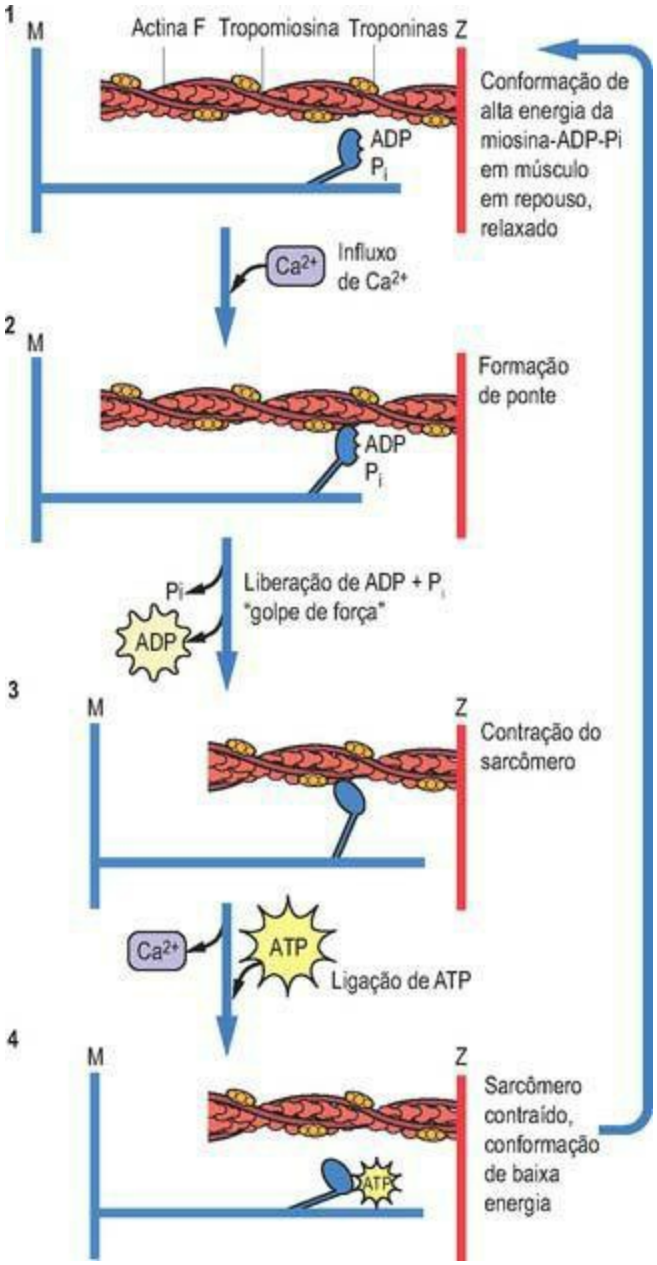


Fig. 20.4 **Estágios propostos na contração muscular, de acordo com o modelo de contração muscular por deslizamento de**

filamentos. (1) Em repouso, músculo relaxado, a concentração de cálcio é de ~10^{-7} mol/L. A cabeça da cadeia de miosina contém ADP e Pi ligados e está estendida a partir do eixo da hélice de miosina numa conformação de alta energia. Embora o complexo miosina-ADP-Pi tenha alta afinidade pela actina, a ligação da miosina à actina é impedida pela tropomiosina, que bloqueia o sítio de ligação à miosina na actina em baixas concentrações de cálcio. (2) Quando o músculo é estimulado, o cálcio entra no sarcoplasma através de canais de cálcio controlados por voltagem (Cap. 8). A ligação de cálcio à Tn-C causa uma alteração conformacional na Tn-I, que é transmitida através da Tn-T à tropomiosina. O movimento da tropomiosina expõe o sítio de ligação à miosina na actina. A miosina-ADP-Pi se liga à actina, formando uma ponte. (3) A liberação do Pi, depois do ADP, da miosina durante a interação com a actina é acompanhada de uma grande alteração conformacional na miosina, produzindo o "golpe de força" que move a cadeia de actina em cerca de 10 nm (100 Å) no sentido oposto à cadeia de miosina, aumentando seu comprimento em superposição dando origem à contração muscular. (4) A captação de cálcio do sarcoplasma e a ligação do ATP à miosina leva ao desligamento da ponte de actomiosina. O ATP é hidrolisado sendo a energia livre desta hidrólise conservada como conformação de alta energia da miosina, estabelecendo o início para a contração contínua em resposta ao próximo pico de concentração de Ca^{2+} no sarcoplasma (compare com a Figura 8.4).

Atividades da miosina ATPase mais altas aumentam os ciclos de formação de pontes, o que permite uma velocidade aumentada de contrações. Isoformas diferentes de miosina têm diferentes níveis de atividade de ATPase, tendo os músculos mais rápidos mais elevadas atividades de ATPase. Isoformas de actina e miosina são, também, encontradas no citoesqueleto de células não musculares, onde estas têm papéis em diversos processos como migração celular, transporte de vesículas durante a endocitose e exocitose, manutenção ou mudança na forma celular e ancoragem de proteínas intracelulares na membrana plasmática.

Acoplamento da excitação e contração: despolarização da membrana muscular

A contração de músculos esqueléticos é iniciada pela estimulação de neurônios na placa motora neuromuscular. Como descrito anteriormente (Fig. 8.4), esse estímulo leva à despolarização do gradiente eletroquímico gerado pela membrana plasmática do músculo (sarcolema). A despolarização, causada por um influxo de Na^+, se propaga rapidamente pela membrana sarcoplasmática e sinaliza para portas de liberação de cálcio dependentes de voltagem do retículo sarcoplasmático (RS), um compartimento sequestrador de cálcio ligado à membrana dentro da célula muscular. O influxo de Ca^{2+} do RS para o sarcoplasma inicia a formação de pontes miosina-actina e o acoplamento excitação-contração (Fig. 20.4). Em músculos estriados, a despolarização é transmitida para o interior da fibra muscular por invaginações da membrana plasmática, chamados túbulos transversos (túbulos T) (Fig. 20.5). A transmissão da despolarização através da rede de túbulos T altamente ramificada, que interage intimamente com o RS, leva à liberação rápida e concatenada de cálcio do RS para o sarcoplasma. Para que a despolarização possa se repetir, o sódio deve ser bombeado ativamente para fora do citosol, por bombas Na^+/K^+-ATPase localizadas no sarcolema. A velocidade de repolarização do músculo é afetada, tanto pela velocidade quanto pela densidade dessas bombas. Níveis mais altos de atividade de Na^+/K^+-ATPase são encontrados em músculos de contração rápida, e o aumento de densidade de bombas Na^+/K^+-ATPase é uma adaptação importante aos exercícios.

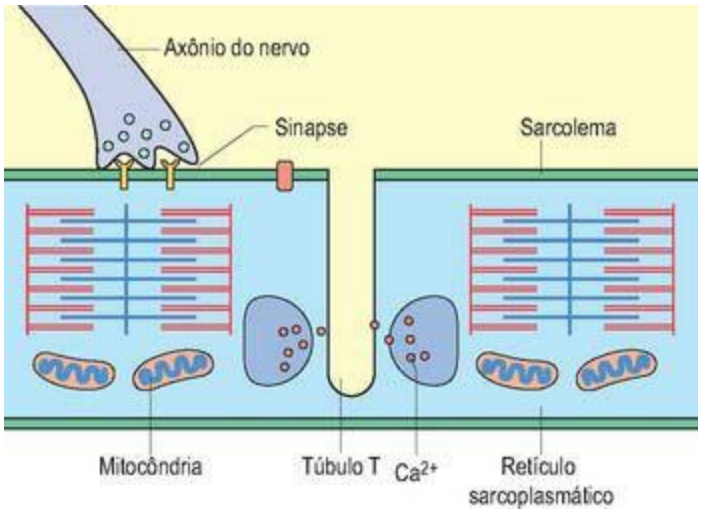


Fig. 20.5 Vista lateral da rede tubular transversa em células de músculo esquelético. Os túbulos transversos são invaginações do sarcolema, que estão em estreita proximidade ao retículo sarcoplasmático (RS). O RS é um compartimento tubular contínuo em estreita associação com as miofibrilas. Os túbulos transversos são extensões do sarcolema ao redor da linha Z. Eles transmitem o impulso nervoso despolarizante para as regiões terminais do RS, coordenando a liberação de cálcio e a contração da miofibrila.

Os músculos esquelético, cardíaco e liso diferem em seus mecanismos de estimulação neural e possuem diferentes adaptações estruturais para propagar a despolarização. A contração da musculatura esquelética é voluntária e as fibras são inervadas por placas terminais de nervos motores que se originam na medula espinhal; a acetilcolina funciona como o seu neurotransmissor (Cap. 41). A junção neuromuscular é uma característica estrutural especializada do músculo esquelético que não é encontrada nos músculos cardíaco ou liso. Cada fibra individual é inervada por um único nervo, e

todas as fibras inervadas por um nervo são definidas como uma unidade motora. O controle e a sincronização da unidade motora é a base para a contração coordenada de um músculo como um todo. As câimbras musculares são contrações musculares não voluntárias resultantes de alterações no controle neuromuscular e/ou de desequilíbrios de eletrólitos após perda excessiva de líquidos, frequentemente durante exercício em condições de calor e umidade.

O músculo cardíaco é estriado e se contrai ritmicamente, sob controle involuntário. O mecanismo geral da contração do músculo cardíaco é similar ao do músculo esquelético; entretanto, o retículo sarcoplasmático é menos desenvolvido e a rede de túbulos transversos é mais desenvolvida no coração. O coração é mais dependente e, realmente, necessita de cálcio extracelular para sua resposta contrátil (Fig. 8.4); o influxo de cálcio extracelular incrementa a liberação de Ca^{2+} do RS. Carentes de um contato neural direto, os miócitos cardíacos medeiam e propagam a despolarização a partir de um nódulo isolado, o nódulo sinoatrial (nódulo SA), através de todo o miocárdio. A despolarização passa de célula a célula por estruturas de membrana especializadas denominadas de discos intercalados. O músculo cardíaco é também mais responsivo à regulação hormonal. Por exemplo, as proteínas quinases dependentes de *c*AMP fosforilam proteínas de transporte e a Tn-I, mediando alterações na força de contração em resposta à epinefrina.

O músculo liso pode responder tanto a fatores neurais quanto a fatores circulantes. Diferentemente do músculo esquelético, a chegada neural para o músculo liso inerva feixes de células musculares lisas que causam contrações do tecido, tanto fásicas (rítmicas), quanto tônicas (sustentadas). O músculo liso pode, também, ser induzido a despolarizar por interações ligante-receptor no sarcolema. Isso é chamado de acoplamento fármaco-mecânico e é a base para a ação de várias drogas que interferem na contração ou relaxamento de músculos lisos. Os doadores de óxido nítrico, como os nitritos de amila e a nitroglicerina, empregados no tratamento da angina, relaxam os músculos lisos vasculares, aumentando o fluxo de sangue para o músculo cardíaco.

O acoplamento excitação-contração: o gatilho de cálcio

O conteúdo de cálcio do sarcoplasma é normalmente muito baixo, 10^{-7} mol/L ou menos, mas aumenta rapidamente em mais de 100 vezes em resposta à estimulação neural. O retículo sarcoplasmático, uma organela especializada derivada do retículo endoplasmático liso, é rico em uma proteína ligante de Ca^{2+}, calsequestrina, e serve como o local de sequestro de cálcio intracelular. Em músculos estriados, a despolarização dos túbulos T abre os canais de Ca^{2+} no RS (Fig. 20.5). O influxo de Ca^{2+} para o sarcoplasma aciona tanto as interações actina-miosina quanto a atividade de ATPase da miosina, levando à contração muscular. As troponinas não são expressas no músculo liso. Nesse caso, o cálcio aciona a contração pela sua ligação à calmodulina e ativação da quinase de cadeia leve da miosina. A fosforilação da miosina aumenta a interação miosina-actina.

O aumento de cálcio intracelular ativa mais pontes miosina-actina e causa o encurtamento do sarcômero através da ativação da ATPase na miosina. Assim, níveis crescentes de cálcio aumentam a força contrátil do músculo, até que seja atingida a saturação. Os bloqueadores de canais de cálcio empregados para o tratamento da hipertensão, tais como a nifedipina (Fig. 7.6), inibem o fluxo de Ca^{2+} para o interior do RS limitando, em consequência, a força de contração de miócitos cardíacos. Enquanto a contração muscular é disparada pelo aumento do cálcio, o relaxamento muscular é dependente do cálcio ser ativamente bombeado de volta ao RS. A velocidade de relaxamento muscular está diretamente relacionada à atividade Ca^{2+}-ATPase do RS. O RS é rico em Ca^{2+}-ATPase, que mantém o cálcio no sarcoplasma em concentrações submicromolares (~10^{-7} mol/L). À medida que os níveis de cálcio do citosol decrescem, o número de pontes diminui e a força de contração muscular também.

METABOLISMO ENERGÉTICO DO MÚSCULO

O ATP é utilizado para a contração muscular

Três ATPases são necessárias para a contração muscular: Na^{+}/K^{+}-ATPase, Ca^{2+}-ATPase e miosina-ATPase. O decréscimo na disponibilidade de ATP ou a inibição de alguma dessas ATPases irá causar uma diminuição na produção de força muscular. Entretanto, a concentração intracelular de ATP não muda drasticamente durante o exercício. A contração muscular ativa se sustenta na regeneração rápida de ATP a partir de ADP. Os sistemas de energia que repõem ATP para a contração muscular incluem a "lançadeira" de fosfato de creatina, a glicólise anaeróbica e o metabolismo aeróbico via fosforilação oxidativa. Os sistemas de energia que regeneram ATP não são equivalentes e afetam diretamente a quantidade e a duração da potência gerada pelo músculo em contração.

Contrações de alta potência e curta duração

Uma realidade metabólica para o músculo esquelético é que a produção de alta força só pode ser mantida por curtos intervalos de tempo. Contrações próximas a ou em níveis de máxima potência dependem de alta atividade de miosina-ATPase e de rápida regeneração de ATP pela fosforilação em nível de substrato a partir do composto de alta energia, creatina fosfato (creatina-P). A creatina (Tabela 9.2) é sintetizada a partir da arginina e da glicina (Fig. 20.6) e é fosforilada reversivamente à creatina-P pela enzima creatina (fosfo)quinase (CK ou CPK). A CK é uma proteína dimérica e existe como três isoenzimas: as isoformas MM (músculo esquelético), BB (cérebro) e MB. A isoforma MB predomina no tecido cardíaco.

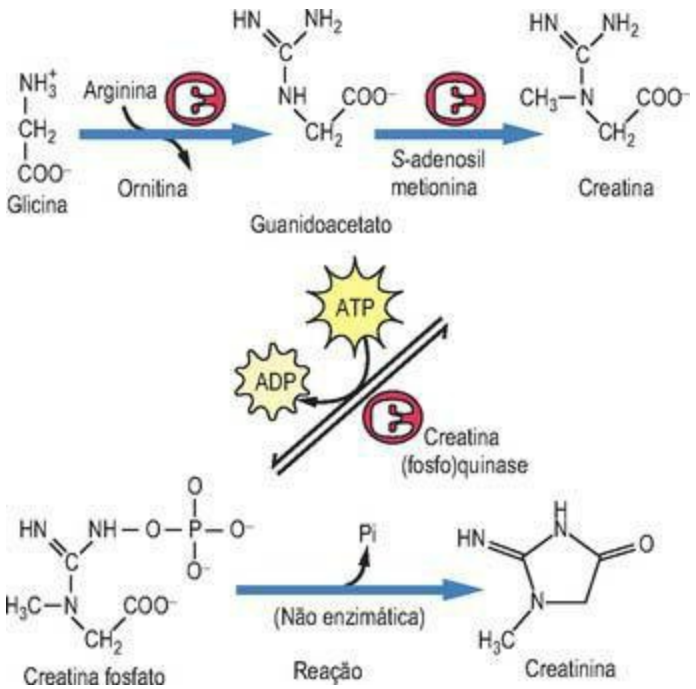


Fig. 20.6 Síntese e degradação da creatina fosfato (creatina-P). A creatina é sintetizada a partir dos precursores da glicina e da arginina. A creatina-P é instável e sofre lenta e espontânea degradação em Pi e creatinina, a forma anidrido cíclica da creatina, que é excretada pela célula muscular no plasma, e deste na urina.

HIPERTERMIA MALIGNA

Cerca de 1 em cada 150.000 pacientes submetidos à anestesia com halotano (halocarbono gasoso) ou tratados com relaxantes musculares responde com rigidez muscular esquelética excessiva e hipertermia severa, com aumento da temperatura em até 2°C (4°F) dentro de uma hora. Caso o tratamento não seja rápido, anormalidades cardíacas podem ser fatais; a mortalidade nessa condição excede 10%. Esta doença genética resulta da liberação excessiva ou prolongada de Ca^{2+} do RS, mais comumente resultado de mutações em gene(s) que codificam proteínas dos canais de liberação de Ca^{2+} do RS. A liberação excessiva de Ca^{2+} leva a um aumento prolongado de concentração de Ca^{2+} no sarcoplasma. A rigidez muscular resulta do consumo de ATP dependente de Ca^{2+} e a hipertermia resulta do aumento do metabolismo para restaurar o ATP. À medida que o metabolismo muscular se

torna anaeróbio, a lactiacidemia e a acidose podem se desenvolver. As anormalidades cardíacas resultam da hipercalemia causada pela liberação dos íons potássio do músculo; como as reservas de ATP estão esgotadas, as células musculares se tornam incapazes de manter os gradientes iônicos através de suas membranas plasmáticas. O tratamento da hipertermia maligna inclui o uso de relaxantes musculares como o dantrolene, um inibidor dos canais de Ca^{2+} sensíveis à rianodina, para inibir a liberação de Ca^{2+} do RS. A terapia de suporte envolve o resfriamento, administração de oxigênio, correções do pH sanguíneo e do balanço de eletrólitos e também tratamento das anormalidades cardíacas.

O nível de creatina-P no músculo em repouso é cerca de três vezes maior do que o de ATP (Tabela 20.3). Dessa forma, a concentração de ATP permanece relativamente constante durante os estágios iniciais do exercício. É restaurado não só pela ação da CK, mas também pela adenilato quinase (mioquinase) como se segue:

Tabela 20.3 Mudanças nas fontes de energia no trabalho muscular. Concentrações de metabólitos energéticos em músculo da perna humana durante exercício em bicicleta. Estes experimentos foram realizados durante exercício isquêmico, o qual exacerba o declínio na concentração de ATP. Eles ilustram o dedínio rápido da creatina-P e o aumento do lactato deri-vado da glicólise anaeróbica do glicogênio muscular.

Metabólito	Concentração de metabólito (mmol/kg peso seco)		
	Repouso	3 minutos	8 minutos
ATP	27	26	19
Creatina-P	78	27	7
Creatina	37	88	115
Lactato	5	8	13
Glicogênio	408	350	282

Creatina fosfoquinase: creatina-P + ADP → creatina + ATP

Adenilato quinase: 2 ADP ⇋ ATP + AMP

As reservas de creatina-P diminuem rapidamente durante o primeiro minuto de demanda de contração muscular de alta potência. À medida que as reservas de creatina-P são gastas, o músculo se torna incapaz de manter a geração de alta força e a força contrátil diminui rapidamente. Nesse ponto, a glicogenólise se torna a maior fonte de energia. A entrada de Ca^{2+} no músculo leva à formação do complexo Ca^{2+}-calmodulina, que ativa a quinase de fosforilase, catalisando a conversão de fosforilase "b" em fosforilase "a". O AMP também ativa alostericamente a fosforilase muscular e a fosfo-frutoquinase-1, acelerando a glicólise a partir do glicogênio muscular (Cap. 12).

Uma diminuição adicional na força ocorre à medida que o piruvato e o lactato se acumulam gradualmente no músculo em contração, ocasionando uma queda no pH muscular. A força então diminuirá para um nível que pode ser mantido pelo metabolismo aeróbico de ácidos graxos. A

potência aeróbica máxima é de cerca de 20% da potência máxima possível e cerca de 50-60% dela (potência aeróbica máxima) podem ser sustentados por longos períodos de tempo.

Contrações de baixa intensidade e longa duração

A disponibilidade e a utilização de oxigênio no trabalho muscular são as maiores limitações para manter uma atividade física contínua. A atividade contrátil de longa duração exige a oferta adequada de oxigênio e a capacidade para o músculo utilizar o oxigênio disponível. A oferta de oxigênio para o músculo é afetada pelas concentrações sanguíneas de hemácias e de hemoglobina, pelo número de capilares dentro do músculo e pela capacidade de bombeamento cardíaco. Os músculos altamente oxidativos dispõem de uma densidade de capilares maior do que os músculos glicolíticos, e esta aumenta pelo treinamento com exercícios de resistência. A utilização de oxigênio pelo músculo também está diretamente relacionada ao número e ao tamanho das mitocôndrias. Os músculos submetidos à atividade contrátil contínua, como os músculos posturais, têm mais mitocôndrias do que os músculos que se contraem pouco frequentemente. Uma observação típica de músculos submetidos a demandas de contração aumentadas é uma elevação da atividade enzimática oxidativa.

Em repouso ou em trabalho físico de baixa intensidade, o oxigênio está prontamente disponível e a oxidação aeróbica de lipídeos predomina como a principal fonte de síntese de ATP. Entretanto, em trabalhos de maior intensidade, a disponibilidade de oxigênio e a utilização de lipídeos podem se tornar limitantes e, consequentemente, a velocidade de trabalho muscular diminui. Durante os primeiros 15-30 minutos de exercício ocorre uma troca gradual da glicogenólise e da glicólise aeróbica para o metabolismo aeróbico de ácidos graxos. Talvez essa seja uma resposta evolucionária para lidar com o fato de que o lactato, produzido pela glicólise, seja mais ácido e menos difusível do que o CO_2. À medida que o exercício continua, a epinefrina contribui para a ativação da gliconeogênese hepática, fornecendo uma fonte exógena de glicose para o músculo. Os lipídeos se tornam, gradativamente, a maior fonte de energia no músculo durante os exercícios de longa duração e baixa intensidade, onde o oxigênio não é um fator limitante.

O desempenho muscular de longa duração (stamina) depende dos níveis de glicogênio muscular

Os corredores de maratonas metaforicamente batem contra a parede quando o glicogênio muscular atinge um nível criticamente baixo. O glicogênio é a forma de reserva de glicose no músculo esquelético e sua concentração muscular pode ser manipulada pela dieta, por exemplo, pelo consumo de carboidratos previamente à corrida de maratona. A fadiga, que pode ser definida como uma incapacidade de se manter a produção de força demandada, ocorre quando a velocidade de utilização de ATP excede a sua velocidade de regeneração. Para uma síntese eficiente de ATP, há uma exigência contínua de um nível basal de metabolismo do glicogênio, mesmo quando a glicose está disponível no plasma e quando as gorduras são as fontes primárias de energia muscular. O metabolismo do glicogênio é importante como uma fonte de piruvato, que é convertido em oxaloacetato pela reação anaplerótica da piruvato carboxilase. O oxaloacetato é exigido para a manutenção da atividade do ciclo do ácido cítrico (TCA), para a condensação com a acetil-CoA derivada dos ácidos graxos. Até certo ponto, o glicogênio muscular pode ser poupado, e o tempo de desempenho aumentado durante atividade física vigorosa de longa duração, pelo aumento da disponibilidade de glicose circulante, quer provenha da gliconeogênese quer da ingestão de carboidratos. A utilização aumentada de ácidos graxos durante estágios iniciais de exercício é uma importante adaptação de treinamento para a atividade física vigorosa regular, que pode, também, servir para poupar reservas de glicogênio (Cap. 21).

O músculo consiste em dois tipos de células musculares: fibras rápidas glicolíticas e fibras lentas oxidativas

As células do músculo estriado são geralmente classificadas por suas propriedades contráteis fisiológicas (rápidas *versus* lentas) e tipo predominante de metabolismo (oxidativo *versus* glicolítico). O tipo de músculo está estreitamente relacionado à função em músculos esqueléticos, e essa comparação pode facilmente ser vista em músculos cujas contrações são de movimentos ocasionais de explosão *versus* músculos utilizados continuamente para a manutenção da postura corporal (antigravidade). As colorações dos dois tipos de músculos estriados os distinguem rapidamente. Os músculos rápidos glicolíticos, utilizados para atividade de explosão, são esbranquiçados na aparência (como o peito de galinha – as galinhas não podem voar longe!), por conta de fluxo sanguíneo menor, densidade de mitocôndrias mais baixa e conteúdo de mioglobina reduzido, comparados com músculos de contração lenta oxidativos que são avermelhados. As fibras rápidas glicolíticas ambém têm reservas elevadas de glicogênio e conteúdos menores de gordura: elas dependem do glicogênio e da glicólise anaeróbica para explosões curtas de contração quando força muscular adicional é requisitada como nas respostas de estresse de "luta ou fuga". Estas fibras musculares não são capazes de manter a contração por períodos longos. Ao contrário, as fibras lentas oxidativas, em músculos posturais (e em peito de ganso – gansos são aves migratórias) são bem perfundidas por sangue, ricas em mitocôndrias e em mioglobulina. Este tipo de músculo tem a capacidade de manter contrações de baixa intensidade por longos períodos. Os músculos lentos utilizam a oxidação de ácidos graxos para a geração de ATP, o que requer mitocôndrias. (O peito de ganso é uma carne bastante gordurosa e escura se comparada ao peito de galinha). O músculo cardíaco, que está em contração contínua, tem várias características contráteis e metabólicas que são similares à s dos músculos esqueléticos onde predominam fibras lentas oxidativas. O músculo cardíaco é bem perfundido por sangue, rico em mitocôndrias e depende muito do metabolismo oxidativo de ácidos graxos circulantes.

SÍNDROMES DE PERDA MUSCULAR

Muitos pacientes com acometimentos que incluem HIV e muitos cânceres sofrem uma grave perda de peso corporal. Os pacientes apresentando "caquexia" têm uma taxa elevada de morbidade e de mortalidade. Essa perda de peso é geralmente independente de uma ingestão calórica diminuída e não está vinculada só ao jejum. Os estimulantes de apetite, isoladamente, são geralmente ineficazes. A perda de peso é associada à perda de massa muscular e de tecido adiposo. Os problemas de saúde podem ser agravados em indivíduos com doença consuptiva devido à desregulação metabólica que acompanha a perda de tecidos adiposo e muscular. Parece haver um efeito do tipo de fibra na perda muscular, que pode estar associada ao metabolismo. Fibras musculares rápidas glicolítica sofrem maior perda de proteína do que as fibras musculares lentas oxidativas. Essa perda preferencial de fibras rápidas glicolíticas com o desgaste se opõe ao que é visto em músculos submetidos a longos períodos de desuso. As fibras lentas oxidativas se atrofiam preferencialmente durante o desuso do músculo. Embora os mecanismos exatos induzindo as síndromes consuptivas não estejam definidos, os primeiros candidatos em várias síndromes consuptivas apontam sinais inflamatórios por citocinas,

como o TNF-α e a IL-6. Os sinais inflamatórios induzidos pela evolução da doença ativam a degradação de proteínas musculares, inibem a síntese de proteínas musculares e induzem a lipólise no tecido adiposo. A manutenção ou a prevenção de perda grave de peso corporal em vários estados de doença pode melhorar as opções de tratamento do paciente, a sobrevivência e a qualidade de vida. Agentes anabolizantes, como a testosterona, têm comprovado benefício na manutenção de massa muscular em pacientes aidéticos e são de amplo uso clínico. Com outras doenças consumptivas, a experiência em modelos animais tem demonstrado que a inibição da sinalização inflamatória pode inibir a perda muscular. Estudos adicionais são necessários antes que essa abordagem seja largamente aplicada à s populações humanas.

DOSAGEM DE CREATININA PARA A AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL E DA DILUIÇÃO DA URINA

Uma vez que a concentração de creatina-P é relativamente constante por unidade de massa muscular, a produção de creatinina (Fig. 20.6) é relativamente constante durante o dia. A creatinina é eliminada na urina em uma taxa relativamente constante por hora, primariamente por filtração glomerular e em menor grau por secreção tubular. Uma vez que sua concentração varia com a diluição da urina, níveis de metabólitos em amostras aleatórias de urina são sempre normalizados para a concentração de creatinina urinária. Caso contrário, uma coleta de 24 h seria necessária para avaliar a excreção diária de um metabólito. A concentração normal de creatinina no plasma é de cerca de 20-80 mmol/L (0,23-0,90 mg/dL). Aumentos na concentração de creatinina plasmática são geralmente utilizados como um indicador de disfunção renal. A relação albumina/creatinina em uma amostra aleatória de urina, um indicador da seletividade de filtração de proteínas do glomérulo, é usada como uma medida da microalbuminúria para avaliar a progressão da nefropatia diabética (Cap. 23).

A QUANTIFICAÇÃO DA TROPONINA CARDÍACA É ESSENCIAL PARA O DIAGNÓSTICO DE INFARTO DO MIOCÁRDIO

O infarto do miocárdio (IM) é o resultado do bloqueio do fluxo sanguíneo para o coração (Cap. 18). O dano do tecido resulta na liberação de enzimas intracelulares para o sangue (Fig. 20.7). Entre estas estão as enzimas glicolíticas, como a LDH (Cap. 12); contudo, as dosagens de mioglobina, CK plasmática total e isoenzimas CK-MB são geralmente mais usadas para o diagnóstico e o acompanhamento do tratamento do IM. A mioglobina é uma proteína pequena (17kDa) e se eleva mais rapidamente no plasma, dentro de duas horas após o IM. Embora seja um teste sensível, não é específica do tecido cardíaco. Ela é retirada rapidamente do sangue pela filtração renal e retorna ao normal em um dia. Uma vez que a mioglobina plasmática também aumenta após um trauma do músculo esquelético, não pode ser útil para o diagnóstico de IM, por exemplo, após um acidente automobilístico. Os níveis plasmáticos totais de CK e das isoenzima CK-MB começam a aumentar entre três e 10 horas após um IM, e atingem um valor de pico em até 25 vezes o valor normal após 12 a 30 horas; eles podem permanecer elevados por três a cinco dias. Os níveis de CK total podem

também aumentar como resultado de dano do músculo esquelético, mas a dosagem de CK-MB dá especificidade para o dano cardíaco.

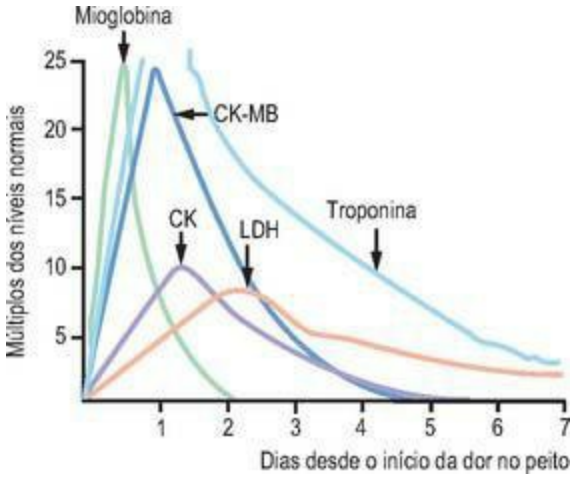


Fig. 20.7 Alterações das enzimas do soro após infarto do miocárdio (IM). Várias enzimas marcadoras se elevam no plasma após um IM. Estas são ainda utilizadas para o diagnóstico de IM, mas o teste recomendado atualmente é a determinação da concentração sérica de troponina. CK, creatina fosfoquinase; CK-MB, isozima cardíaca da CK; LDH, lactato desidrogenase.

Adaptado de Pettigrew AR, Pacanis A. Diagnosis of myocardial infarction. In: Dominiczak MH (ed) Seminars in Clinical Biochemistry. University of Glasgow Computer Publishing Unit, Glasgow, 1997.

Comentário. Ensaios de imunoabsorção ligada à enzima (ELISA) para troponinas miocárdicas são atualmente recomendados para o diagnóstico e acompanhamento do tratamento do IM. Esses testes dependem da presença de isoformas específicas de subunidades de troponina no coração adulto. A concentração de Tn-T no plasma aumenta em poucas horas após o ataque cardíaco, atinge picos de até 300 vezes a concentração normal do plasma e pode permanecer elevada por uma a duas semanas. Um ensaio para uma isoforma específica no coração adulto, Tn-T_2, é essencialmente 100% sensível para o diagnóstico do IM e apresenta menos de 5% de resultados falso-positivos. Aumentos significantes da Tn-T plasmática são detectáveis mesmo em pacientes com angina instável e episódios transitórios de isquemia no coração. As troponinas são comumente usadas como um componente de um algoritmo para diferenciar pacientes de alto risco dos de baixo risco em termos da necessidade de intervenção invasiva imediata. A definição recente de infarto do miocárdio é baseada na observação das concentrações de troponina.

DESENVOLVIMENTO E REGENERAÇÃO DO MÚSCULO

Para compreender a regulação muscular, é importante entender sua origem e seu desenvolvimento. O músculo é derivado de células em proliferação que se originam da camada germinativa mesenquimal no embrião em desenvolvimento. Estas células são "determinadas" dentro à linhagem muscular e se tornam mioblastos. Os mioblastos podem "deixar" o ciclo celular e se diferenciar em células musculares de fenótipo maduro. A diferenciação envolve a ativação sequencial de genes músculo-específicos, incluindo proteínas contráteis, por proteínas reguladoras de transcrição ligantes de DNA da família dos fatores reguladores miogênicos (FRMs). Mioblastos terminalmente diferenciados no coração são denominados miócitos cardíacos; estas células permanecem com um ou dois núcleos por toda a vida. Até o momento, nenhuma célula precursora miogênica foi encontrada no tecido cardíaco, o que pode explicar a limitada capacidade regenerativa do coração após a lesão.

Mioblastos de músculo liso também se diferenciam em células musculares lisas maduras (CML), mas, diferentemente do músculo cardíaco e esquelético, estas não estão terminalmente diferenciadas. Os fenótipos das CML também variam, com base nas suas localização e função. As CMLs são encontradas por todo o corpo na parede vascular e retêm a capacidade de proliferar, por exemplo, em resposta à hipertensão ou durante a angiogênese.

As células musculares esqueléticas diferem dos outros tipos de células musculares no fato de serem multinucleadas. Os mioblastos em proliferação se fundem e se diferenciam terminalmente para formar um miotubo multinucleado. A inervação por uma placa motora neural terminal induz o miotubo a adquirir as características de fibra muscular madura. As células-satélite são células indiferenciadas, precursoras de músculo, encontradas somente no músculo esquelético. Uma vez que os núcleos de fibras musculares são pós-mitóticos, a proliferação e diferenciação de células-satélite são eventos críticos para o crescimento pós-natal do músculo, por exemplo, em resposta ao exercício e na regeneração após uma lesão. Considera-se que as alterações na diferenciação das células-satélite, com o avanço da idade ou em síndromes consuptivas, contribuam para a perda de massa esquelética nessas condições.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Quando galinhas são assustadas, elas cacarejam muito e alto, podem saltar e voar por curtas distâncias, mas são incapazes de alçar voo e voar a grandes distâncias, quer normalmente ou para escapar do perigo. Em contraste, os gansos têm habilidade de voar por longas distâncias, por exemplo, durante migrações semianuais. Compare os tipos de fibras musculares e as fontes de energia no peito de galinhas e de gansos e explique como as diferenças nos tipos de fibras são compatíveis com a capacidade de voo dessas aves.

2. Discuta o impacto da deficiência da fosforilase do glicogênio muscular (doença de McArdle) e a deficiência da carnitina ou da carnitina palmitoil transferase I na performance muscular durante os exercícios de curta e de longa duração.

3. Reveja os méritos do *doping* sanguíneo, carga de carboidrato e suplementação de creatina para aumentar o desempenho durante provas de maratona.

Resumo

O músculo é o maior consumidor de combustíveis e ATP no corpo. Tanto a glicólise quanto o metabolismo lipídico são essenciais para a atividade muscular. A dependência nessas vias de produção de energia varia com o tipo de músculo e sua atividade contrátil prioritária. O ATP produzido no músculo controla a manutenção de gradientes iônicos, a restauração dos níveis de cálcio intracelular e o processo contrátil. O músculo rápido glicolítico depende muito do glicogênio e da glicólise anaeróbica para a atividade muscular de explosões curtas de alta intensidade. O músculo lento oxidativo é um tecido aeróbico; em repouso, utiliza gorduras como sua principal fonte de energia. Durante as fases iniciais de exercício, ele depende da glicogenólise e da glicólise, mas depois, gradativamente, se adapta ao metabolismo de gorduras para a produção de energia a longo prazo.

Os músculos esquelético, cardíaco e liso têm em comum um complexo actomiosina contrátil, mas diferem na inervação, arranjo de proteínas contráteis e na propagação célula a célula da despolarização. O sarcômero é a unidade contrátil fundamental do músculo estriado e é definido pelas linhas Z e pela superposição de filamentos espessos e finos. A contração é descrita pelo modelo do "deslizamento de filamentos" no qual a hidrólise de ATP é deflagrada por um influxo de Ca^{+2} no sarcoplasma e é acoplada a mudanças de conformação da miosina. O relaxamento da conformação de alta energia da miosina durante a interação com a actina produz o "golpe de força", resultando em crescente superposição dos filamentos de actina e miosina e o encurtamento do sarcômero. Medidas da atividade de CK são utilizadas como marcador de lesão muscular esquelética. As determinações de troponina são atualmente investigações essenciais no diagnóstico de infarto do miocárdio.

Leituras sugeridas

Coffey VG, Hawley JA. The molecular bases of training adaptation. *Sports Med*. 2007;37:737-763.

Joseph AM, Pilegaard H, Litvintsev A, Leick L, Hood DA. Control of gene expression and mitochondrial biogenesis in the muscular adaptation to endurance exercise. *Essays Biochem.* 2006;42:13-29.

Nistasla R, Stump CS. Skeletal muscle insulin resistance is fundamental to the cardiometabolic syndrome. *J Cardiometab Syndr*. 2006;1:47-52.

Thomas DR. Loss of skeletal muscle mass in aging: examining the relationships of starvation, sarcopenia and cachexia. *Clin Nutr*. 2007;4:389-399.

Yudkin JS. Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome. *Horm Metab Res*. 2007;39:707-709.

Sites

Deficiência de carnitina Deficiência de carnitina. www.medicine.com/ped/htm.

Doença de McArdle. www.muscular-dystrophy.org/information_resources/factsheets/medical_conditions_factsheets/mcardles.html.

Distrofia muscular Distrofia muscular. www.ninds.nih.gov/health_and_medical/disorders/md.htm.

www.nlm.nih.gov/medlineplus/musculardystrophy.html

Animações Animações:

http://trc.ucdavis.edu/biosci10v/bis10v/week10/08muscularsystem.html

http://entochem.tamu.edu http://entochem.tamu.edu/MuscleStrucContractswf/index.html

Homeostase da Glicose e Metabolismo Energético

M.H. Dominiczak

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Caracterizar os principais substratos energéticos (combustíveis metabólicos).
- Resumir as ações da insulina e do glucagon.
- Comparar o metabolismo no jejum com o pós-prandial.
- Descrever a resposta metabólica à injúria e compará-la com o metabolismo no diabetes.
- Caracterizar diabetes tipo 1 e tipo 2.
- Explicar os princípios dos exames de laboratório relevantes para o metabolismo energético e no monitoramento do diabetes.

O aporte contínuo de energia é essencial para a manutenção da vida. Este capítulo descreve o metabolismo de compostos conhecidos como substratos energéticos (combustíveis metabólicos) em diferentes circunstâncias. Além de discutir a doença metabólica mais comum, o diabetes melito.

Os substratos energéticos mais importantes são a glicose e os ácidos graxos: ambos podem ser armazenados no corpo

Os substratos energéticos mais importantes em mamíferos são a glicose e os ácidos graxos. Após a ingestão de alimentos, seu excesso é armazenado para ser novamente liberado, caso necessário. Isso salvaguarda o suprimento de energia entre as refeições e, em circunstâncias extremas, pode garantir a sobrevivência de um organismo por semanas e meses. As principais vias dos combustíveis metabólicos e os metabólitos-chave estão listados na Tabela 21.1.

Tabela 21.1 Principais vias anabólicas e catabólicas e seus principais substrates e produtos.

Principais vias anabólicas e catabólicas e seus principais substrates e produtos

Vias	Principals substrates	Produtos finais
Anabólicas		
gliconeogênese	lactato, alanina, glicerol	glicose
síntese de glicogênio	G-1-P	glicogênio
síntese de proteína	aminoáddos	proteínas
síntese de ácidos graxos	acetil-CoA	ácidos graxos
lipogênese	glicerol, ácidos graxos	triacilgliceróis (triglicerídios)
Catabólicas		
glicólise	glicose	piruvato, ATP
ciclo do áddo tricarboxilíco	piruvato	$NADH + H^+$, $FADH_2$
		acetil-CoA, piruvato CO_2, H_2O, ATP
glicogenólise	glicogênio	G-1-P glicose
via das pentoses fosfato	G-6-P	$NADPH + H^+$, pentoses, CO_2
oxidação de ácidos graxos	ácidos graxos	CO_2, H_2O, ATP (cetonas)
lipólise	triacilgliceróis	glicerol, ácidos graxos
proteólise	proteínas	aminoáddos, glicose

Note que metabólitos como o piruvato e o acetil-CoA são comuns a diferentes vias. Isso permite as suas regulações integradas. Note ainda quais vias geram equivalentes redutores (NADH, NADPH e FADH 2) servindo como substratos para a cadeia respiratória mitocondríal.

A glicose é armazenada como glicogênio e pode ser sintetizada de compostos não carboidratos

Em circunstâncias normais, a glicose é o único combustível usado pelo cérebro; dessa forma seu suprimento contínuo é essencial para a sobrevivência. A glicose

também é preferencialmente usada pelo músculo durante os estágios iniciais de exercício. A despeito da grande demanda ocasional, a quantidade de glicose livre presente no fluido extracelular é pequena – somente cerca de 20 g, o equivalente à 80 kcal (335 kJ). Para garantir o suprimento contínuo, a glicose pode ser liberada na circulação do "estoque de emergência" de seu polímero, o glicogênio. O glicogênio é armazenado no fígado (aproximadamente 75 g, e no músculo (400 g). Isso é equivalente a cerca de 1.900 kcal (7.955 kJ) e pode garantir um suprimento de glicose para aproximadamente 16 horas de jejum (compare as Tabelas 19.1 e 20.3). Se o jejum é mais longo, outro mecanismo de suprimento de glicose entra em jogo: sua síntese de compostos não carboidratos (gliconeogênese). A garantia de um suprimento contínuo de glicose é uma das principais funções do metabolismo energético.

Os ácidos graxos são armazenados como ésteres do glicerol (triacilgliceróis ou triglicerídeos) e não podem ser convertidos em carboidratos

O corpo tem uma capacidade quase ilimitada de acumular gordura no tecido adiposo na forma de ésteres de glicerol (triacilgliceróis). O valor calórico das gorduras (9 kcal/g, 37 kJ/g) é maior do que o dos carboidratos (4 kcal/g, 17 kJ/g) ou das proteínas (4 kcal/g) (Tabela 22.3). Um homem de 70 kg terá aproximadamente 15 kg de gordura armazenada. Isso é equivalente a mais de 130.000 kcal (544.300 kJ; compare com o valor calórico do glicogênio anterior). Os ácidos graxos podem garantir as necessidades energéticas do corpo por longos períodos de jejum. Em circunstâncias extremas, as pessoas podem jejuar por períodos de 60-90 dias e as pessoas obesas podem sobreviver mais de um ano sem comida.

Os aminoácidos podem ser usados como um combustível após a conversão em glicose

Os aminoácidos normalmente não são uma fonte de energia, mas são substratos para a síntese das proteínas do corpo. Entretanto, em certas situações, eles se tornam substratos energéticos. Primeiro, durante um jejum prolongado ou durante um estresse metabólico induzido por doença ou lesão, as proteínas do corpo são degradadas e os aminoácidos constituintes são convertidos em glicose pela gliconeogênese. Segundo, quando uma quantidade excessiva de aminoácidos é obtida com a alimentação, eles são convertidos em carboidratos e são armazenados ou metabolizados (Cap. 19).

Os vários órgãos e tecidos lidam com os combustíveis de forma diferente

Em repouso, o cérebro usa aproximadamente 20% de todo o oxigênio (O_2) consumido pelo corpo. A glicose é normalmente o único combustível do cérebro: durante a inanição, entretanto, o cérebro pode usar cetonas como uma fonte alternativa de energia.

As duas vias endógenas que produzem glicose são a glicogenólise e a gliconeogênese. Quando a concentração de glicose no fluido extracelular diminui, esta

é rapidamente reabastecida pela degradação do glicogênio hepático. Entretanto, quando o jejum se estende, mais glicose começa a ser produzida pela gliconeogênese. A gliconeogênese ocorre principalmente no fígado, mas os rins contribuem durante o jejum prolongado. Os principais substratos para a gliconeogênese são o lactato (da glicólise anaeróbica), a alanina (da quebra de proteínas musculares) ou o glicerol (da quebra de triacilgliceróis do tecido adiposo) (Cap. 13).

O músculo usa tanto a glicose quanto os ácidos graxos como fontes de energia. Durante um exercício curto, a glicose é o substrato preferido, mas no repouso e no exercício prolongado os ácidos graxos são a principal fonte de energia (Cap. 20). O músculo lida com os carboidratos de forma diferente do fígado. Ele não pode liberar glicose diretamente na corrente sanguínea porque, ao contrário do fígado, ele não possui a enzima glicose-6-fosfatase (Gli-6-Pase). Portanto, o músculo somente pode usar o glicogênio para suas próprias necessidades energéticas. Entretanto, ele contribui para a gliconeogênese hepática liberando lactato, o qual é transportado para o fígado.

HOMEOSTASE DA GLICOSE

No estado de jejum, uma pessoa que pese 70 kg metaboliza glicose em uma taxa de aproximadamente 2 mg/kg/min (200 g/24 h). A concentração de glicose no plasma reflete o balanço entre sua captação (absorção de glicose no intestino) ou sua produção endógena (glicogenólise e gliconeogênese) e sua utilização pelos tecidos (glicólise, via das pentoses fosfato, ciclo do ácido tricarboxílico [TCA] e síntese de glicogênio) (Fig. 13.2).

A insulina e o glucagon são os principais hormônios responsáveis pelo controle da concentração plasmática de glicose

A homeostase da glicose é controlada, por um lado, pelo hormônio anabólico insulina e, por outro, por hormônios catabólicos (glucagon, catecolaminas, cortisol e hormônio do crescimento), conhecidos também como hormônios anti-insulínicos ou contrarregulatórios (Fig. 21.1).

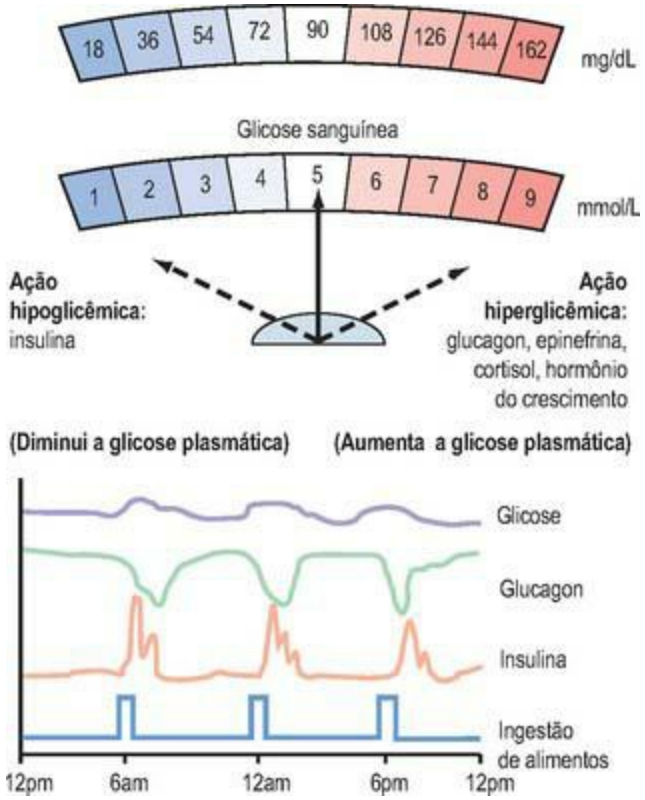


Fig. 21.1 Controle hormonal da homeostase da glicose. A concentração plasmática de glicose reflete o balanço entre a ação hipoglicêmica (diminuição de glicose) da insulina e a ação hiperglicêmica (aumento de glicose) dos hormônios anti-insulínicos. A parte inferior da figura ilustra os padrões diários da secreção de insulina e de glugacon e o padrão correspondente da concentração plasmática de glicose. A concentração de glicose é mantida dentro de uma faixa relativamente regular ao longo do dia. Para obter a concentração de glicose em mg/dL, multiplique por 18.

A insulina e o glucagon são secretados da mesma localização anatômica – as ilhotas pancreáticas de Langerhans. A insulina é secretada pelas células β (aproximadamente 70% de todas as células das ilhotas) e o glucagon, pelas células α. A razão molar insulina/glucagon em um dado momento é a chave determinante para o metabolismo de combustíveis.

INSULINA

A molécula de insulina

A molécula de insulina consiste em duas cadeias peptídicas ligadas por duas pontes dissulfeto. A cadeia α contém 21 aminoácidos e a cadeia β contém 30 aminoácidos. Seu peso molecular é 5.500 Da. A insulina é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso das células β pancreáticas e é empacotada nas vesículas secretórias no aparelho de Golgi. O precursor da insulina é uma molécula de cadeia única, a pré-pró-insulina. Primeiro, uma sequência sinal de 24 aminoácidos é clivada da pré-pró-insulina por uma peptidase, gerando pró-insulina. A pró-insulina é então clivada por endopeptidases em insulina e peptídio C (Fig. 21.2 e quadro da pág. 94), os quais são liberados da célula em quantidades equimolares. Isso é explorado na clínica laboratorial para avaliação da função das células β em pacientes tratados com injeções de insulina. Nesses pacientes, a insulina endógena não pode ser dosada diretamente, uma vez que a insulina administrada poderia interferir na análise. Entretanto, como o peptídio-C está presente na mesma concentração molar que a insulina nativa, ele serve como um marcador da função das células β.

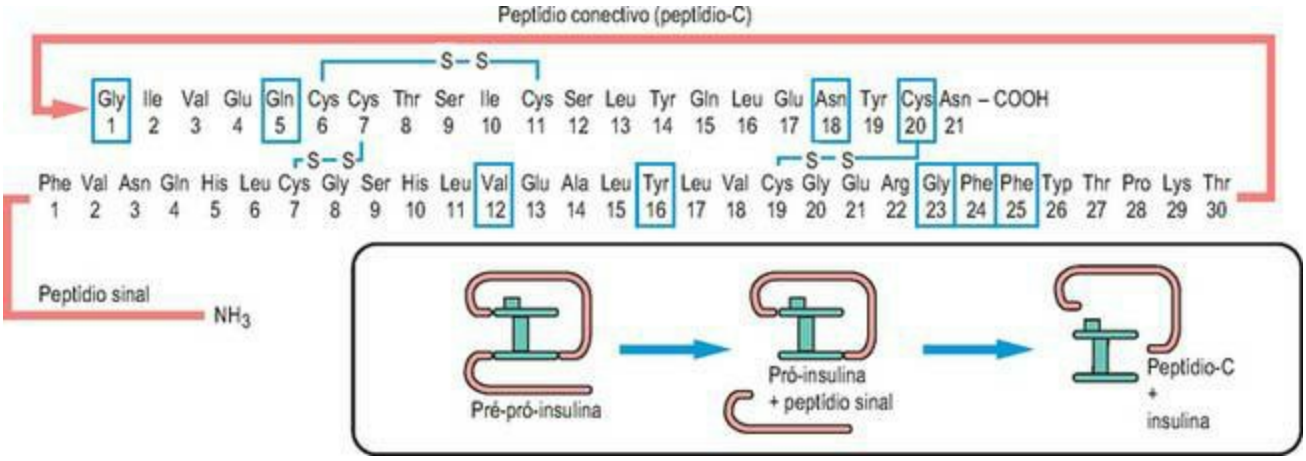


Fig. 21.2 Insulina. A molécula de insulina consiste em duas cadeias polipeptídicas unidas por duas pontes dissulfeto. A terceira ligação é no interior da cadeia β. A insulina é sintetizada como um peptídio maior, pré-pró-insulina, que é clivado em peptídio sinal e pró-insulina. Antes da secreção da célula β, a pró-insulina ainda é clivada em peptídio-C e insulina. Os quadros desenhados em volta dos resíduos de aminoácidos indicam os aminoácidos participantes da ligação da insulina ao receptor.

A secreção de insulina é determinada pelo metabolismo da glicose nas células β

Durante uma refeição contendo carboidratos, a concentração de glicose é percebida pelas células β pancreáticas. À medida que a glicose entra na célula β, a taxa aumentada de seu metabolismo dispara a secreção de insulina (isso é conhecido como o acoplamento metabolismo-secreção). Em paralelo à estimulação da secreção de insulina, a glicose suprime a secreção de glucagon.

As células β captam glicose pelo transportador de membrana GLUT-2 (Cap. 8 e Tabela 8.2). Ao entrar na célula, a glicose é fosforilada pela glicoquinase. Conforme o metabolismo de glicose é estimulado, a razão ATP/ADP na célula aumenta. Isso fecha os canais de potássio sensíveis ao ATP na membrana celular e despolariza a célula, abrindo canais de cálcio. Os íons cálcio entram na célula (Cap. 40) e estimulam a liberação de grânulos secretores contendo insulina pré-formada. Isso é conhecido como a primeira fase da secreção de insulina (compare isso com os grânulos

neurossecretores, Cap. 41) (Fig. 21.3). A perda dessa fase é o sinal funcional precoce de dano à s células das ilhotas. A segunda fase da secreção de insulina envolve a síntese de nova insulina e responde a sinais tais como um aumento na concentração citossólica de acil-CoA de cadeia longa.



Fig. 21.3 Fases da secreção de insulina. Note as duas fases da secreção de insulina. A glicose é o fator estimulador mais importante na secreção de insulina, mas a secreção é também estimulada por alguns aminoácidos (aminoácidos de cadeia ramificada), pela estimulação do nervo vago e por hormônios secretados pelo intestino.

Hormônios intestinais potencializam a secreção de insulina

A secreção de insulina também é estimulada por aminoácidos como leucina, arginina e lisina. Os hormônios gastrointestinais, como o peptídio insulinotrópico dependente de glicose (GIP), colecistoquinina, peptídio-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e peptídio intestinal vasoativo (VIP), secretados após a ingestão de alimentos, potencializam a secreção de insulina. Isso explica por que a resposta insulínica à administração de glicose oral é maior do que a resposta à sua infusão intravenosa. GLP-1 e GIP são degradados pela enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-4).

Ação da insulina

A sinalização da insulina nas células envolve um receptor de membrana e cascatas de fosforilação de várias etapas

Muito progresso tem sido realizado nos últimos anos com relação ao nosso entendimento de como a molécula de insulina conduz sua mensagem metabólica (Fig. 21.4; compare com a Figura 13.7).

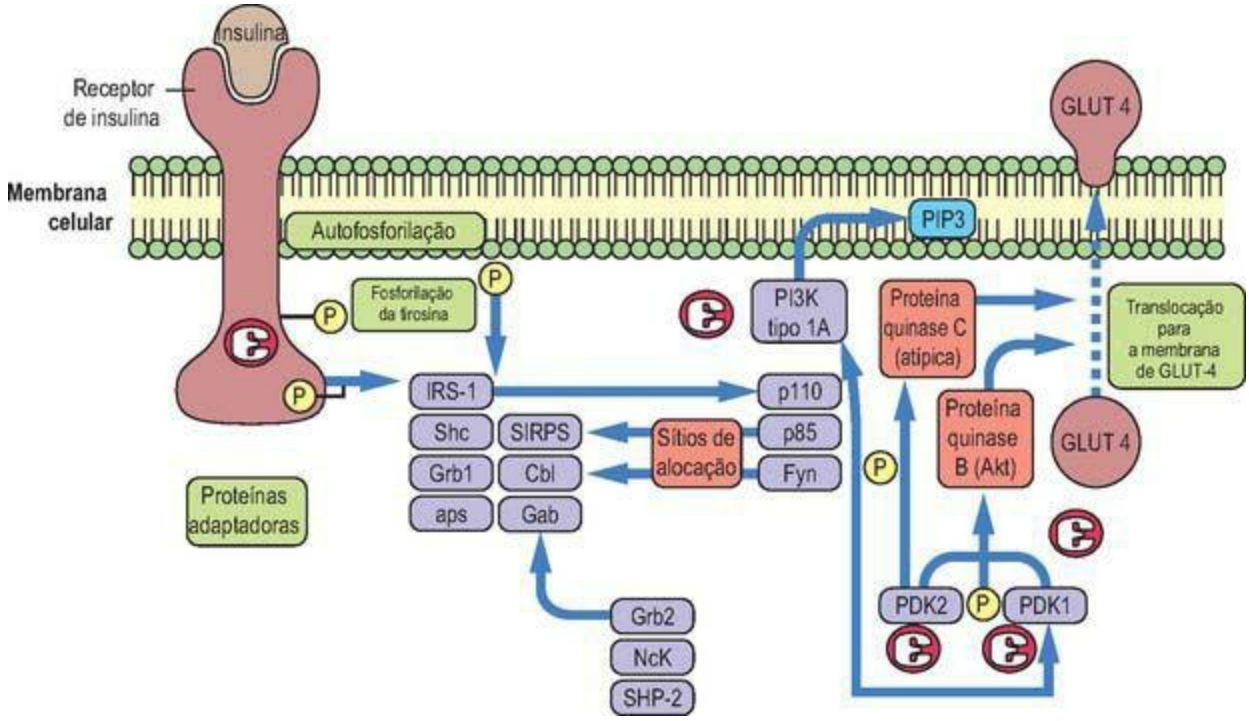


Fig. 21.4 Sinalização da insulina. A cascata de sinalização da insulina transfere o sinal da molécula de insulina para moléculas-alvo, tais como as enzimas reguladoras em vias-chave ou pelo transportador de membrana de glicose GLUT-4. Uma via sinalizadora induz o receptor de insulina, pela fosforilação do receptor, a fosforilação de IRS-1, a fosfoinositol (PI3) quinase, e então PDKs e duas quinases, Akt/PKB e PKC. Existem também outros mediadores da ação da Akt e da PKC (não mostrados aqui) que determinam o movimento do GLUT-4 entre o retículo endoplasmático e a membrana celular (Fig. 13.7). PDK, quinase dependente de fosfoinositídio; PKB, proteína quinase B; PKC, proteína quinase C.

A propagação celular do sinal da insulina inclui fosforilações múltiplas em diferentes sítios (a fosforilação em tirosina envia sinais diferentemente da fosforilação em serina-treonina). Essas fosforilações ajudam a criar mudanças conformacionais que permitem a ligação (alocação) de outras proteínas, que transferem o sinal à frente.

Em primeiro lugar, a insulina liga-se a seu receptor, uma proteína de quatro subunidades, que atravessa as membranas das células-alvo. A subunidade β do receptor contém um sítio de ligação ao ATP e apresenta atividade tirosina quinase. A ligação da insulina leva à autofosforilação do receptor. O receptor também recruta e fosforila várias outras proteínas: substratos dos receptores de insulina, denominados IRS1-4, e proteínas adaptadoras Gab1, Shc, Grb1, SIRPS, e outras. Essas por sua vez geram sítios de alocação para outras proteínas, tais como a fosfatidilinositol 3-quinase 1A (PI3K), proteína tirosina fosfatase (SHP2) e Fyn quinase.

PI3K gera mensageiros derivados de lipídeos, os fosfatidilinositol fosfatos: PI-3,4-P2 e PI-

3,4,5-P3 (Cap. 40). Por sua vez, estes recrutam a serina-treonina quinase (proteína quinase B, PKB, também chamada de Akt) e as quinases dependentes de 3′-fosfoinositídio 1 e 2 (PDK1 e 2). PDK1 fosforila PKB e PKC (ver a seguir). Uma forma de PKB conhecida como PKB β está envolvida no transporte de glicose e sua translocação nos adipócitos. Várias isoformas de outra quinase, a proteína quinase C atípica (PKC), estão envolvidas no transporte de glicose nos adipócitos e no músculo esquelético. Esta se torna ativada quando seu domínio regulatório liga mensageiros lipídicos, tais como o inositol trifosfato, e após a fosforilação pela PDK-1.

As serina-treonina quinases também podem fosforilar IRS1: isso diminui sua suscetibilidade à fosforilação pelo receptor de insulina, introduzindo mais uma volta regulatória. Além disso, as fosfatases tais como fosfotirosina fosfatase 1B, contribuem para cessar o sinal da insulina.

Finalmente, existe a via de sinalização da insulina independente de PI3K, que também ativa o transporte de glicose; o receptor de insulina fosforila uma proteína denominada Cbl, usando o substrato associado à proteína (APS) como um adaptador. A Cbl fosforilada liga a proteína associada à Cbl (CAP). Por sua vez, A CAP liga-se à flotilina, uma proteína associada a lipídeos da membrana. A flotilina aloca o fator de troca de nucleotídeo guanina (C3G) com a mediação de outra molécula adaptadora, CrkII. Isso ativa uma proteína G denominada TC-10, que participa na translocação de GLUT-4 nos adipócitos.

Efeitos metabólicos da insulina

A insulina promove o estado anabólico canalizando metabólitos no sentido do armazenamento de carboidratos e de lipídeos, e no sentido da síntese de proteínas. Ela também suprime importantes vias catabólicas. A insulina age em três principais tecidos-alvo: fígado, tecido adiposo e músculo esquelético (Fig. 21.5).

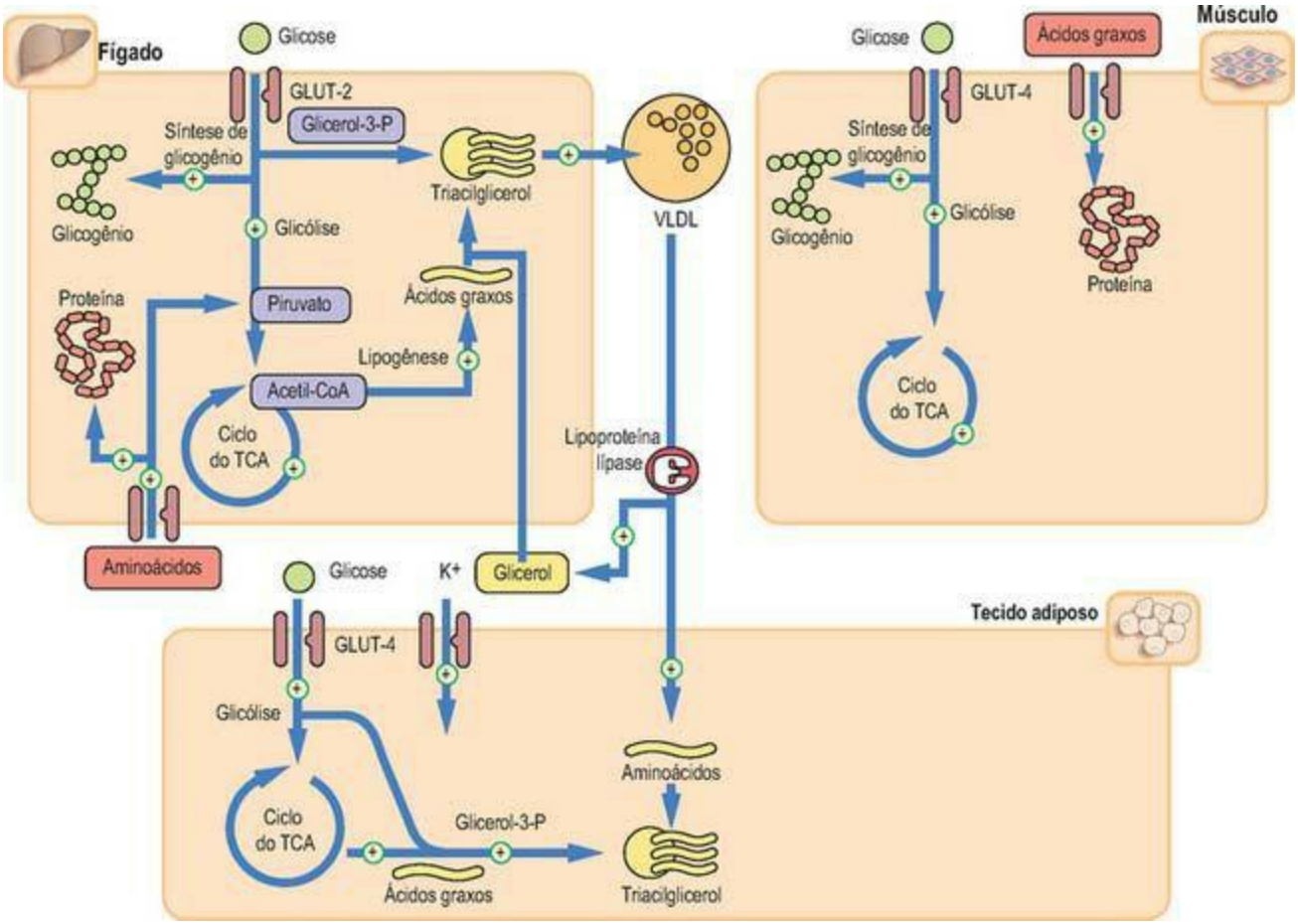


Fig. 21.5 Efeitos metabólicos da insulina. Os principais tecidos-alvo da insulina são os tecidos hepático, muscular e adiposo. A insulina afeta o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, e também promove a captação de potássio celular. O transporte de glicose no músculo e no tecido adiposo é mediado pelo transportador GLUT-4 e é dependente de insulina. Entretanto, o transportador de glicose no fígado (GLUT-2) é independente de insulina (compare com a Figura 13.7).

No fígado, a insulina estimula a glicólise e a síntese de glicogênio. Ao mesmo tempo, ela suprime a lipólise e a gliconeogênese. Ela estimula a síntese de ácidos graxos de cadeia longa e triacilgliceróis (essa última conhecida como lipogênese). Ela promove o transporte de lipídeos do fígado para as células periféricas envolvendo partículas de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Nos tecidos periféricos, a insulina induz a lipoproteína lípase endotelial, uma enzima que libera triacilglicerol dos quilomícrons e da VLDL (Cap. 18).

No tecido adiposo, a insulina estimula a síntese de triacilglicerol, de glicerol-3-fosfato e ácidos graxos.

No músculo, ela estimula o transporte de glicose, o metabolismo de glicose e a síntese de glicogênio. Ela aumenta a captação celular de aminoácidos e estimula a síntese de proteínas.

Transporte de glicose dependente de insulina através da membrana celular

A entrada de glicose dependente de insulina nas células é mediada por transportadores de glicose (Tabela 8.2). O transportador GLUT-4 controla a captação de glicose no músculo esquelético e nos adipócitos. GLUT-4 desloca-se de forma cíclica entre o compartimento endossomal e a membrana. Em uma célula não estimulada, a maior parte das moléculas de GLUT-4 está presente intracelularmente e não mais do que 10% estão presentes na membrana plasmática. Em humanos, a insulina dobra o recrutamento do transportador para a membrana celular. A translocação de GLUT-4 é afetada pelos sinais da insulina transmitidos através de IRS1, fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), PKB/Akt e PKC atípica. É importante destacar que a contração muscular aumenta a expressão de GLUT-4 independentemente da insulina. Por sua vez, os ácidos graxos diminuem a expressão de GLUT-4 nos músculos.

A resistência à insulina é um fator importante no desenvolvimento de diabetes tipo 2

A resistência à insulina é uma condição na qual a insulina produz uma resposta menor do que esperada. Isso pode ser devido à sua síntese ou à sua secreção inadequadas ou, com maior frequência, à incapacidade de a molécula de insulina exercer seu efeito normal em uma célula. Os indivíduos com resistência moderada à insulina apresentam concentração plasmática de glicose normal, mas têm hiperinsulinemia. Isso indica que é necessária mais insulina para produzir um efeito "normal". Quando a resistência à insulina se torna mais severa, a concentração plasmática de glicose aumenta. Clinicamente, isso é visto primeiro como tolerância à glicose diminuída e posteriormente como diabetes tipo 2. A resistência à insulina é comum na obesidade, a qual é um importante fator de risco para o desenvolvimento de diabetes do tipo 2.

A causa mais importante de resistência à insulina é a sinalização pela insulina deficiente

Dentro de uma célula, a resistência à insulina pode ser causada por defeitos em vários níveis (Tabela 21.2). Ela pode ser uma ligação comprometida da insulina a seu receptor, por exemplo, devida a uma mutação muito rara do gene do receptor de insulina. A resistência também pode ser causada por autoanticorpos antirreceptores. As causas mais importantes, entretanto, são defeitos nas vias de sinalização da insulina. No diabetes tipo 2 e em pessoas com um forte histórico familiar de diabetes, a via IRS-fosfatidilinositol quinase pode não operar normalmente. Isso diminui a translocação intracelular do transportador GLUT-4 e, consequentemente, a captação de glicose pelo tecido adiposo. A expressão reduzida e a translocação prejudicada de GLUT-4 nos adipócitos (mas não no músculo esquelético) têm sido observadas na obesidade e no diabetes. Curiosamente, os adipócitos de camundongos deficientes em GLUT-4 (*knock-out* para GLUT-4) também demonstram a superexpressão de um gene para outra proteína, a proteína de ligação ao retinol (RBP). Embora a RBP se origine nos adipócitos, foi descoberto que ela diminui a sinalização da insulina no músculo; dessa forma, ela serve como um mensageiro intertecidual que propaga a resistência à insulina.

Tabela 21.2 Locais de resistência à insulina.

Locais de resistência à insulina		
Local de resistência	**Possível defeito**	**Papel no diabetes**
Pré-receptor	anticorpos para receptor de insulina, molécula anormal	raro
Receptor	diminuição do número ou da afinidade dos receptores de insulina	não é significante no diabetes
Pós-receptor	defeitos na transdução de sinal: defeito na fosforilação da tirosina, mutações nos genes que codificam para IRS-1, fosfatidilinositol-3′ quinase translocação defeituosa de GLUT-2 para a membrana celular	a resistencia do pós-receptor é o tipo mais comum de resisteência à insulina
	concentração elevada de ácidos graxos	

Outras causas de resistência à insulina incluem as variantes dos genes que codificam IRS1 e fosfatidilinositol 3-quinase. Ácidos graxos elevados também contribuem para a resistência à insulina por meio da inibição da disponibilidade periférica de glicose, aumentando a saída de glicose hepática e prejudicando a função das células β. A esteatose (acúmulo de triacilgliceróis no fígado e no músculo), vista em pacientes com dislipidemia e alta concentração plasmática de triacilgliceróis, também contribui para a resistência à insulina.

EXISTEM VÁRIOS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À INSULINA

A resistência à insulina pode ser avaliada por meio de testes de função, que são usados principalmente para fins de pesquisa. Um desses testes é o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico: a insulina é infundida em uma velocidade constante junto de quantidades variadas de glicose. A velocidade da infusão de insulina é ajustada para manter a concentração plasmática de glicose em

55,5 mmol/L (90-99 mg/dL). Quando um estado estacionário é atingido, a velocidade de infusão de insulina é igual à captação periférica de glicose e é uma medida da sensibilidade/resistência à insulina. Outros testes de resistência à insulina são baseados no teste oral de tolerância à glicose (ver a seguir) e envolvem medidas frequentes das concentrações plasmáticas de glicose e de insulina após uma carga de glicose.

Efeitos metabólicos do glucagon e dos hormônios anti-insulínicos

Os hormônios anti-insulínicos antagonizam o efeito da insulina, promovendo a hiperglicemia

Os hormônios anti-insulínicos mobilizam glicose por meio da estimulação da glicogenólise e da gliconeogênese. Isso causa um aumento da concentração plasmática de glicose (hiperglicemia).

O glucagon age no fígado

O glucagon é um pequeno peptídeo de cadeia simples com 29 aminoácidos, com um peso molecular de 3.485 Da. Ele age no fígado e sua função é mobilizar as reservas de combustíveis para manter a concentração sanguínea de glicose entre as refeições. Ele direciona o metabolismo no sentido catabólico e inibe o anabolismo. Ele estimula a glicogenólise, a gliconeogênese (Tabela 21.3), a oxidação de ácidos graxos e a cetogênese, e inibe a glicólise, a síntese de glicogênio e a síntese de triacilgliceróis (lipogênese) (Fig. 21.6).

Tabela 21.3 Efeitos recíprocos da insulina e do glucagon nas enzimas-chave da gliconeogênese

Efeitos recíprocos da insulina e do glucagon nas enzimas-chave da gliconeogênese		
Enzima	**Efeito do glucagon**	**Efeito da insulina**
Glc-6-Pase	+	–
Fru-1,6-BPase	+	–
PEPCK	+	–

Em uma dieta rica em carboidratos, a insulina induz a transcrição de genes das enzimas glicolíticas glicoquinase, PFK, piruvato quinase e glicogênio sintase. Ao mesmo tempo, ela reprime as enzimas-chave da gliconeogênese, piruvato carboxilase (PC), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), Fru-1,6-BPase e Glc-6-Pase. Os efeitos do glucagon se opõem àqueles da insulina. Em uma dieta rica em gorduras, o glucagon reprime a síntese de glicoquinase, PFK-1 e piruvato quinase, e induz a transcrição de PEPCK, Fru-6-Pase e Glc-6-Pase.

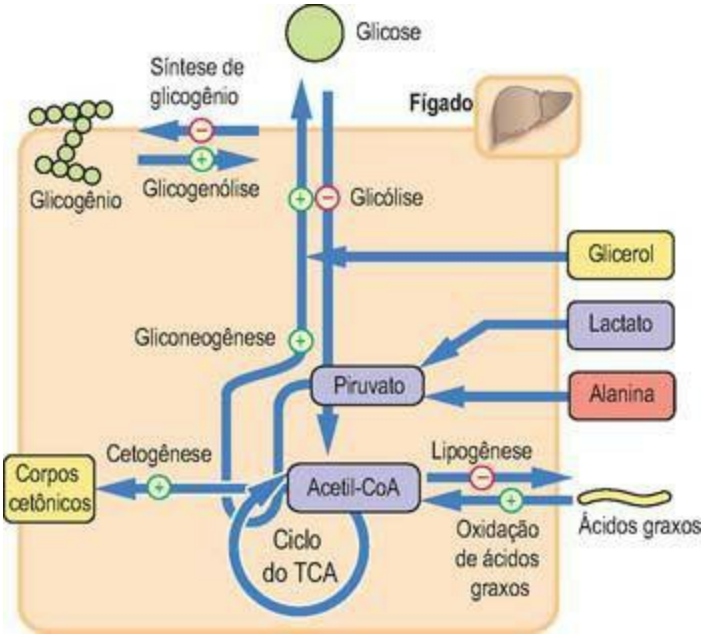


Fig. 21.6 Efeitos metabólicos do glucagon. O glucagon metaboliza glicose de qualquer fonte disponível; ele também aumenta a lipólise e a cetogênese de acetil-CoA. A ação do glucagon é limitada ao fígado (compare com Figura 13.4).

O glucagon liga-se ao seu próprio receptor de membrana (Cap. 13, Fig. 13.4), que sinaliza por meio de proteínas G associadas à membrana e à cascata do AMP cíclico. Primeiro, o complexo glucagon-receptor faz a ligação da guanosina 5′-trifosfato (GTP) a um complexo da proteína-G (Cap. 40). Isso leva à dissociação das subunidades de proteína G. Uma das subunidades (Ga) ativa a adenilato ciclase, a qual converte ATP em AMP cíclico (cAMP). O cAMP por sua vez ativa uma proteína quinase dependente de cAMP que, por meio de fosforilação de várias enzimas reguladoras, controla a atividade das enzimas-chave no metabolismo dos carboidratos e dos lipídeos (Figs. 21.6 e 21.7).

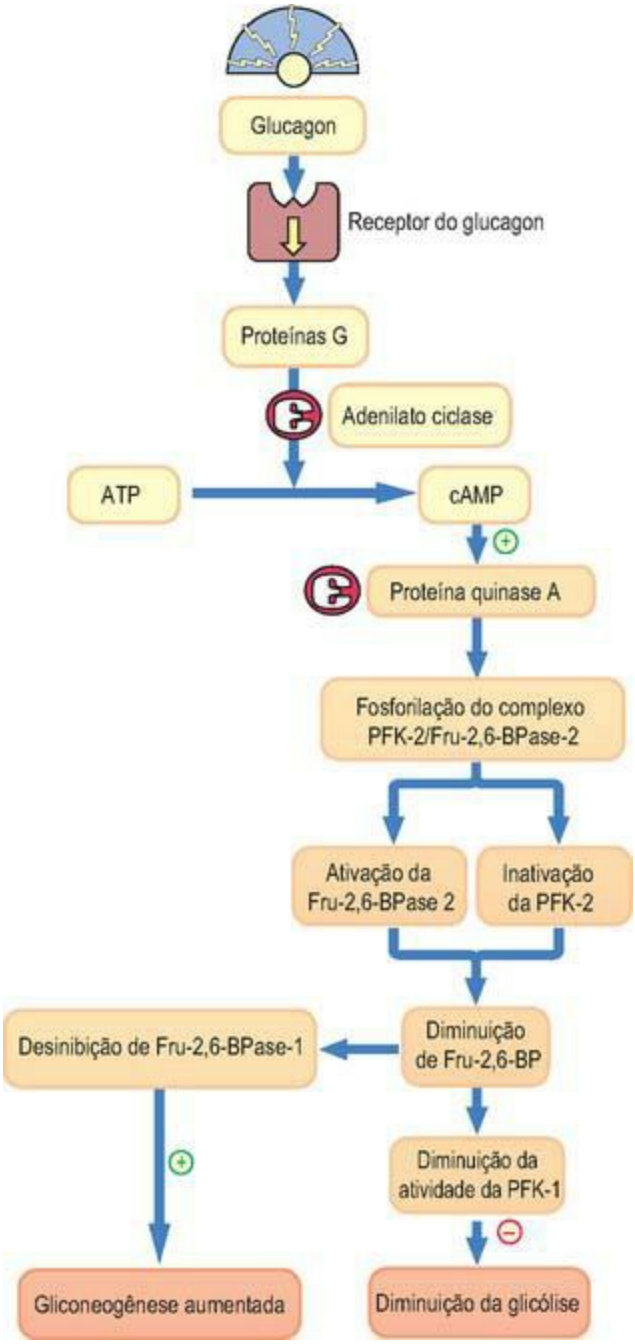


Fig. 21.7 Regulação da glicólise e da gliconeogênese pela fosfofrutoquinase. O glucagon regula a gliconeogênese por meio do controle do complexo enzimático bifuncional que contém as atividades da fosfofrutoquinase-2 (PKF-2) e da frutose 2,6-bifosfatase-2 (Fru-2,6-BPase-2). O glucagon se liga a seu receptor de membrana e sinaliza pela proteínas G e adenilato ciclase, gerando cAMP. O cAMP ativa a proteína quinase A. Essa quinase, por sua vez, fosforila o complexo PFK-2:Fru-2,6-BPase. A fosforilação ativa a bifosfatase que degrada Fru-2,6-BP. A diminuição de Fru-2,6-BP desinibe outra enzima, a Fru-2,6-BPase 1, na via gliconeogênica principal. A gliconeogênese é estimulada. Engenhosamente, a diminuição na Fru-2,6-BP tem um efeito inibitório recíproco na fosfofrutoquinase principal (PFK-1). Isso inibe a glicólise. De forma global, a ação do glucagon resulta na estimulação da gliconeogênese e na inibição da glicólise.

É importante ressaltar que não existem receptores para glucagon nas células musculares; a glicogenólise muscular é estimulada por outro hormônio anti-insulínico, a epinefrina.

A ação da epinefrina

Os efeitos metabólicos da epinefrina (adrenalina) são similares aos do glucagon. Ela inibe a glicólise e a lipogênese, e estimula a gliconeogênese. Seus receptores são os receptores α e β adrenérgicos (principalmente o receptor β_2; Fig. 13.5), e eles estão ligados à cascata de sinalização do cAMP. A epinefrina é um hormônio-chave responsável pela hiperglicemia em resposta ao

estresse.

Os hormônios regulam enzimas-chave em vias metabólicas por meio de diferentes mecanismos

A forma de mudar a velocidade e a direção das vias metabólicas é controlar a atividade de enzimas-chave (reguladoras). Essas enzimas reguladoras são os alvos dos hormônios. A regulação da atividade enzimática pode ser exercida por meio de diferentes mecanismos: indução e repressão de genes que codificam essas enzimas, fosforilação e desfosforilação das moléculas dessas enzimas, e outros mecanismos tais como interações com o substrato e alterações alostéricas. O nível energético da célula e seu estado redox também controlam suas atividades (Cap. 6).

Os fatores de transcrição controlam diretamente a indução gênica

A indução ou a repressão de genes (Tabela 21.3) leva dias ou semanas para acontecer, e pode ocorrer em resposta à dieta, estresse crônico ou enfermidade. Por exemplo, as atividades de várias enzimas hepáticas são diferentes entre pessoas com uma dieta rica em gordura em comparação com aquelas com uma dieta rica em carboidrato.

A indução gênica é controlada por proteínas conhecidas como fatores de transcrição que se ligam a elementos de resposta nos promotores dos genes (Cap. 34, Fig. 34.2). Os fatores de transcrição agem por meio de complexos traducionais que incluem mais de um fator de transcrição e outras moléculas denominadas coativadoras e correpressoras. Essa complexidade permite diferentes respostas transcricionais em diferentes tecidos e também interações entre diferentes genes. Os fatores de transcrição por si próprios são frequentemente alvos de cascatas de sinalização hormonal.

A fosforilação é um mecanismo regulatório-chave em vias metabólicas e em cascatas de sinalização

A regulação de curto prazo envolve a fosforilação e a desfosforilação de moléculas-chave. As enzimas são comumente controladas por esse mecanismo. As cascatas de sinalização frequentemente envolvem vários níveis de quinases e fosfatases. A fosforilação/desfosforilação é também um mecanismo que pode regular fatores de transcrição. As Figuras 21.7 e 21.8 ilustram como esse mecanismo controla enzimas que regulam a glicogenólise, a gliconeogênese e a lipólise.

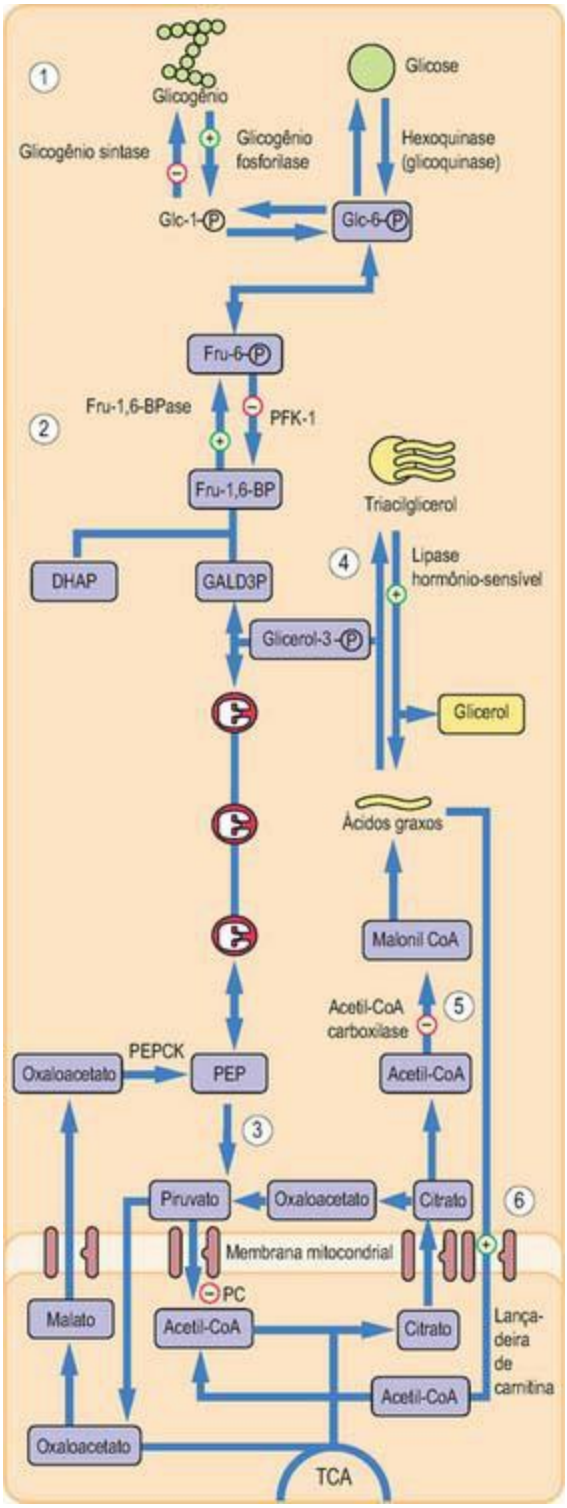


Fig. 21.8 Função reguladora da fosforilação enzimática. O metabolismo dos carboidratos e dos lipídeos é regulado pela fosforilação de enzimas-chave, controlada pelo glucagon e pela epinefrina. Note que a fosforilação geralmente estimula as enzimas em vias catabólicas e inibe aquelas nas vias anabólicas. Então:
No metabolismo do glicogênio: a glicogênio fosforilase é ativada e a glicogênio sintase é inativada. Isso promove a quebra do glicogênio (1). **Na gliconeogênese:** a Fru-2,6-BPase 2 é ativada e a PFK-2 é inibida. Isso diminui a formação de Fru-2,6-BP, a qual inibe PFK-1 (glicólise) e estimula a FBPase (gliconeogênese) (2). **Na glicólise:** a Fru-1,6-PB também ativa alostericamente a piruvato quinase mais abaixo da via glicolítica. Como sua formação é diminuída, a glicólise diminui (3). **Na lipólise:** a fosforilação estimula a lipólise estimulada pela lípase hormônio-sensível (a liberação de ácidos graxos a partir dos triacilgliceróis) (4). **Na oxidação de ácidos graxos:** a fosforilação inibe a acetil-CoA carboxilase, inibindo a geração de malonil CoA (5). O malonil-CoA normalmente inibe carnitina palmitol transferase-1. A falta de malonil-CoA a desinibe (6), facilitando a entrada de ácidos graxos na mitocôndria. Isso estimula a oxidação de lipídeos. DHAP, di-hidroxiacetona fosfato; GALD3P, gliceraldeído-3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato.

A insulina e o glucagon ligam e desligam genes durante o ciclo alimentado-jejum

A insulina regula a síntese de enzimas-chave controlando a atividade dos chamados fatores de transcrição com cabeça em garfo (possuem uma estrutura em hélice-alça-hélice com duas laçadas ou asas). Dois desses fatores de transcrição, Foxo1 e Foxa2, são essenciais para a mudança do metabolismo de anabólico para catabólico. O fator de transcrição Foxo1 promove a gliconeogênese no fígado no estado de jejum, e Foxa2 regula a oxidação de ácidos graxos. Ambos são inativados pela fosforilação por quinases na via IRS-PKB/Akt.

Foxo1 e seus coativadores Pgc-1 e TORC2 (este último respondendo ao cAMP) estimulam a gliconeogênese ativando genes que codificam as enzimas limitadoras da velocidade PEPCK e G-6-Pase. Durante o estado alimentado, a insulina, novamente pela via de IRS-PKB/Akt, fosforila Foxo1, inativando-o. Isso inibe a gliconeogênese hepática. A insulina também desativa TORC2. O glucagon, por sua vez, desfosforila TORC2, ativando-o e facilitando a indução de enzimas da gliconeogênese.

Foxa2 regula a quebra de gorduras no estado de jejum pela indução de genes que codificam enzimas da glicólise, da oxidação de ácidos graxos e da cetogênese. Isso leva a um aumento nas concentrações de ácidos graxos livres, de corpos cetônicos e de triacilgliceróis, e a uma diminuição do conteúdo de triacilglicerol hepático. A insulina fosforila e inibe Foxa2 pela via de IRS-PKB/Akt.

A SENSIBILIDADE DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO À INSULINA PODE VARIAR

O fator de transcrição Foxa2 é mais sensível ao desligamento pela insulina do que Foxo1. Isso cria uma situação na qual a insulina pode estimular a lipogênese e inibir a oxidação de ácidos graxos controlada por Foxa2, mas falha em suprimir a gliconeogênese controlada por Foxo1. Isso leva à inibição paralela da gliconeogênese e da lipogênese e resulta no acúmulo de triacilgliceróis no fígado (esteatose hepática). A esteatose agrava a resistência à insulina (Fig. 34.2).

PAPEL REGULATÓRIO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO PPARγ

Os receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs) são receptores nucleares ativados por ligantes pertencentes à família de receptores esteroides. A ligação de um ligante induz uma mudança conformacional que permite a um PPAR formar um heterodímero com outro receptor, o receptor X de retinoide (RXR). PPAR também pode ligar ou liberar pequenas moléculas coativadoras ou correpressoras. O complexo liga-se a elementos de resposta nos promotores dos genes (Fig. 21.9).

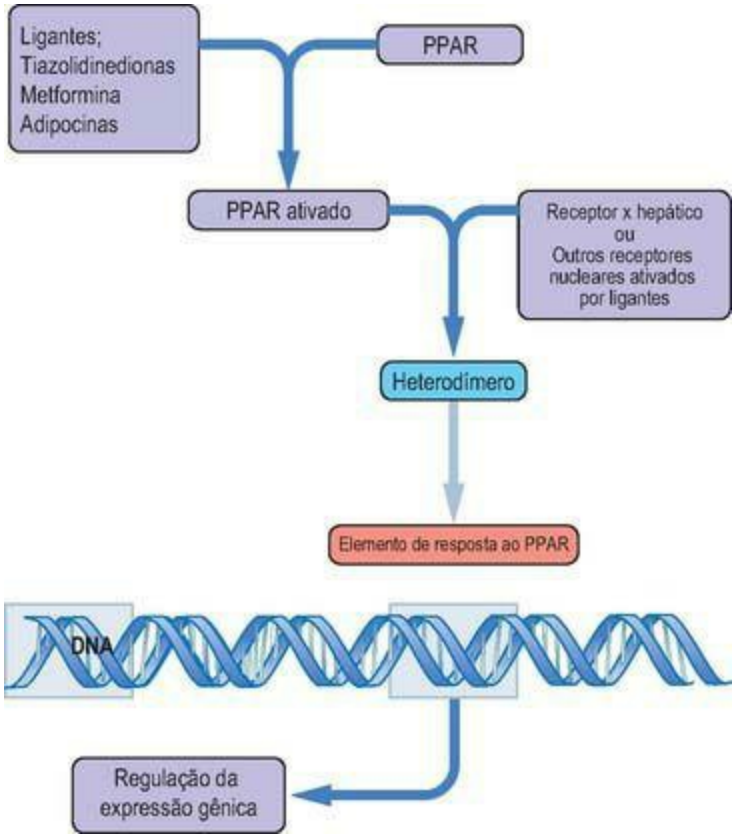


Fig. 21.9 Regulação transcricional pelos receptores ativadores da proliferação de peroxissomas (PPARs). Os PPARs são ativados por ligantes que podem ser metabólitos ou drogas. Eles formam complexos heterodiméricos com uma série de outros receptores nucleares. Os complexos resultantes ligam-se aos elementos de resposta aos PPARs localizados nos promotores dos genes, regulando a expressão gênica.

Existem três tipos de PPAR: PPARα que é discutido no capítulo 18, PPARγ e PPARβ. PPARγ é predominatemente expresso no tecido adiposo, mas também no músculo, no fígado, no intestino e no coração. Ele é ativado por ácidos graxos poli-insaturados e por componentes da LDL oxidada. Ele regula o metabolismo de carboidratos e de ácidos graxos induzindo, dentre outros, os genes que codificam a lipoproteína lipase (LPL), o transportador de glicose GLUT-4 e a glicoquinase. Ele também induz o transportador ABCA1 aumentando a transferência de colesterol das células para o HDL (Cap. 18). Ele também inibe a ativação de macrófagos e a produção de citocinas tais como o fator de necrose tumoral (TNF-α), interferon-γ e interleucina-1 (IL-1). PPARα é um alvo de tiazolidinas-dionas, drogas usadas no tratamento de diabetes do tipo 2.

HIPOGLICEMIA

Definimos hipoglicemia (baixa glicemia) como uma concentração de glicose sanguínea abaixo de 4 mmol/L (72 mg/dL). A baixa glicose plasmática estimula o sistema nervoso simpático. A epinefrina e o glucagon são liberados, iniciando uma resposta ao estresse, manifestada como sudorese, tremores, aumento da frequência cardíaca e uma sensação de fome. Se a glicose sanguínea continuar a baixar, a função cerebral é comprometida em função da falta de glicose (neuroglicopenia: isso normalmente acontece quando a concentração de glicose cai para menos do que 2,5 mmol/L (45 mg/dL)). A pessoa torna-se confusa e pode perder a consciência. A hipoglicemia profunda pode ser fatal.

A hipoglicemia em indivíduos sadios é normalmente branda e pode ocorrer durante o exercício, após um período de jejum ou como resultado da ingestão de álcool. O álcool aumenta a razão NADH + H^+/NAD^+ intracelular, que favorece a conversão de piruvato em lactato e reduz a quantidade de piruvato disponível para a gliconeogênese (quadro clínico da pág. 168). A hipoglicemia também pode ocorrer quando existe uma quantidade insuficiente de hormônios contrarregulatórios para balancear os efeitos da insulina: isso acontece na insuficiência adrenal ou pituitária, quando a concentração de cortisol é baixa (na insuficiência pituitária, existe uma quantidade insuficiente de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, Cap. 39). Outra causa endócrina de hipoglicemia é um raro tumor de células β, insulinoma, que secreta grandes quantidades de insulina. As doenças de armazenamento de glicogênio são causas raras de hipoglicemia na infância (Cap. 13 e quadros clínicos das págs. 158 e 163). As causas de hipoglicemia estão resumidas na Figura 21.10.



Fig. 21.10 Causas de hipoglicemia. A hipoglicemia é a concentração plasmática de glicose abaixo de 4 mmol/L (72 mg/dL). A hipoglicemia grave é a concentração de glicose abaixo de 2,5 mmol/L (45 mg/dL). A hipoglicemia pode resultar de um suprimento de glicose diminuído ou de um aumento na concentração de insulina. Ela também resulta de uma utilização aumentada de glicose pelos tecidos (exercício).

CICLO ALIMENTAÇÃO-JEJUM

O metabolismo humano oscila entre os estados alimentado e de jejum. O interruptor-chave que determina as alterações metabólicas é a razão molar de insulina e de glucagon no plasma. Um estado de alta insulina/baixo glucagon ocorre durante uma refeição e por várias horas após (isso é chamado de estado absortivo, pós-prandial ou alimentado) e um estado de baixa insulina/alto glucagon ocorre no jejum. Um período de jejum de 6-12 horas é chamado de estado pós-absortivo. O jejum que dura mais do que 12 horas é o “jejum prolongado” ou “inanição”.

Estado alimentado (absortivo)

A refeição estimula a liberação da insulina e inibe a secreção de glucagon

Os nutrientes em uma refeição estimulam a liberação de insulina e suprimem a secreção de glucagon. Isso afeta o metabolismo do fígado, do tecido adiposo e do músculo (Fig. 21.11). A utilização de glicose pelo cérebro se mantém inalterada.

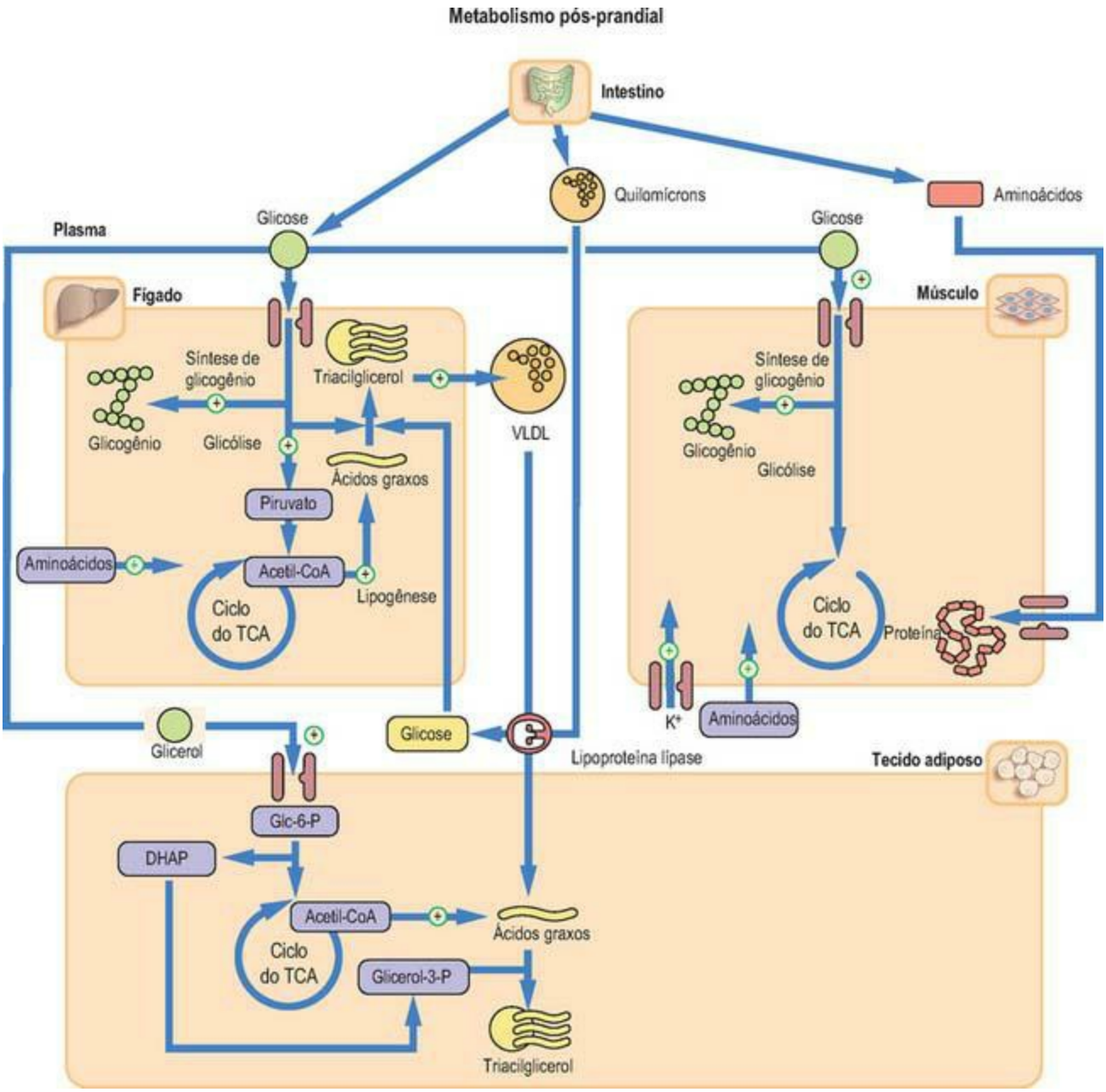


Fig. 21.11 Metabolismo no estado alimentado (pós-prandial). Os carboidratos, os aminoácidos e as gorduras são absorvidos no intestino e a secreção de insulina é estimulada. A insulina direciona o metabolismo em direção ao armazenamento e à síntese (anabolismo). No fígado, a glicose é captada pelo transportador GLUT-2 e é canalizada para a glicólise e para a síntese de glicogênio. A glicólise aeróbica fornece a acetil-CoA, que é um substrato para a lipogênese. Os ácidos graxos sintetizados são esterificados ao glicerol derivado da glicólise formando triacilgliceróis. Eles são empacotados na VLDL para transporte para os tecidos periféricos. A síntese de glicogênio muscular, a captação de aminoácidos e a síntese de proteínas são estimuladas. No tecido adiposo, os triacilgliceróis da VLDL são hidrolisados e os ácidos graxos são captados pelas células. Os triacilgliceróis são ressintetizados intracelularmente como material de armazenamento do adipócito. DHAP, di-hidroxiacetona fosfato; Glc-6-P, glicose-6-6fosfato (compare com a Figura 16.8).

Existe um aumento na captação de glicose pelos tecidos dependentes de insulina, principalmente pelos músculos esqueléticos. A oxidação da glicose e a síntese de glicogênio são estimuladas e a oxidação de lipídeos é inibida. A glicose captada pelo fígado é fosforilada pela glicoquinase, gerando Glc-6-P. A glicose em excesso é direcionada para a via das pentoses fosfato, gerando NADPH + H^+, que é utilizado nas reações de biossíntese que requerem redução, tais como a síntese de ácidos graxos e de colesterol.

As gorduras (triacilgliceróis) absorvidas no intestino são transportadas em quilomícrons para os tecidos periféricos, onde são hidrolisadas em glicerol e ácidos graxos livres pela lipoproteína lipase (Cap. 18). Os ácidos graxos são captados pelas células. Eles são reorganizados em triacilgliceróis e armazenados; no músculo, são usados como combustível. A síntese de triacilgliceróis necessita de glicerol, que é fornecido pela glicólise (as trioses fosfato sendo reduzidas a glicerol-3-fosfato). A insulina estimula a síntese de ácidos graxos no fígado e no tecido adiposo. Ela também estimula a captação de aminoácidos e a síntese de proteínas, e diminui a degradação de proteínas no fígado, no músculo e no tecido adiposo.

Estado de jejum (pós-absortivo)

Durante o jejum, o fígado muda de um órgão utilizador de glicose para um órgão produtor de glicose

Durante o jejum, a secreção de insulina diminui e a secreção de glucagon aumenta (Fig. 21.12). Como consequência, existe uma diminuição na síntese de glicogênio e um aumento na glicogenólise. Isso transforma o fígado de um órgão utilizador para um órgão produtor de glicose. Após um jejum de uma noite, é alcançado um estado estacionário, no qual a produção hepática de glicose é igual à sua captação periférica.

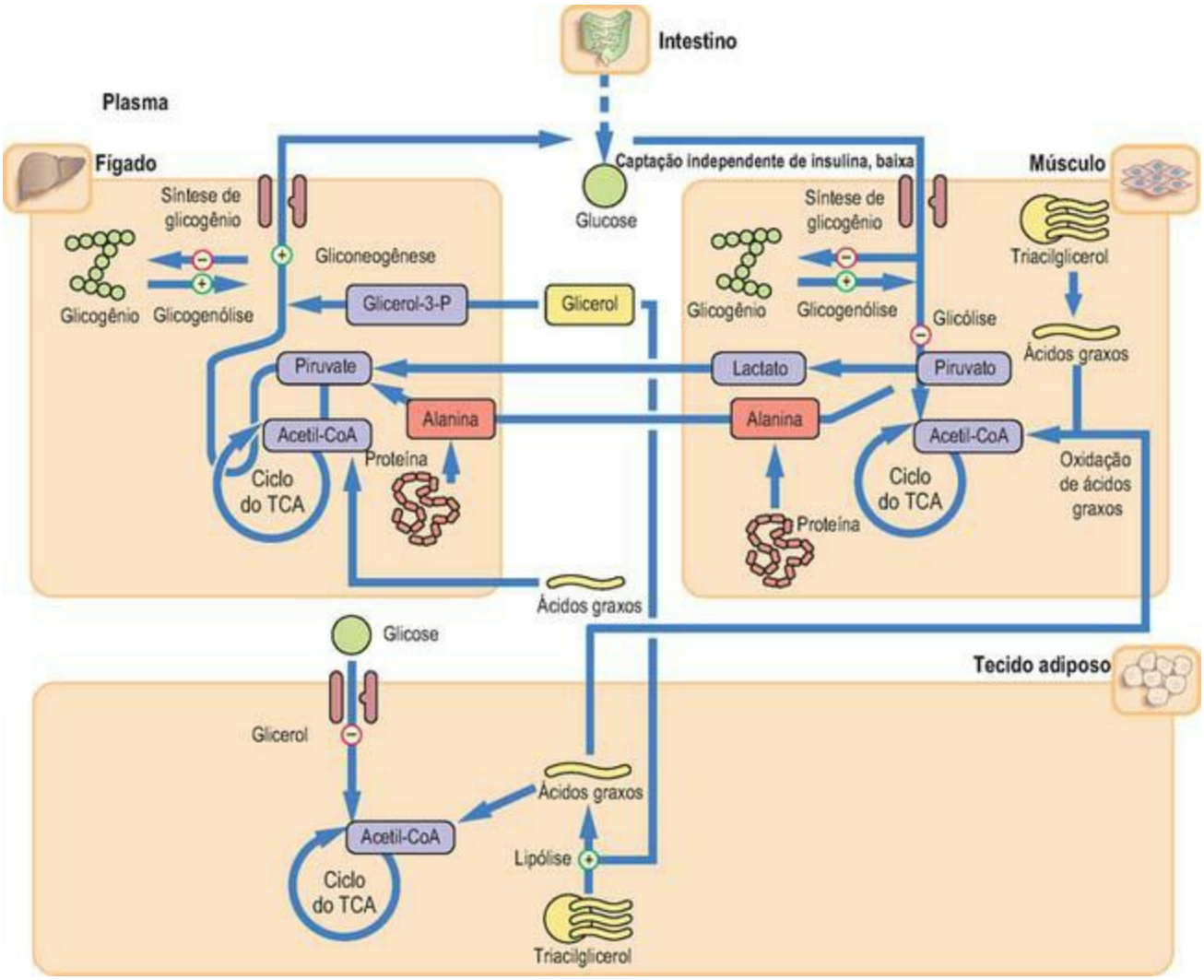


Fig. 21.12 Metabolismo após jejum de uma noite (pós-absortivo). O metabolismo hepático deixa de utilizar glicose e passa a produzi-la (a gliconeogênese é estimulada pelo glucagon). O glucagon também estimula a glicogenólise e inibe a glicólise. Note os substratos para a gliconeogênese: alanina, lactato e glicerol. A alanina e o lactato são transportados para o fígado do músculo (Fig. 21.13). A captação de glicose pelo músculo e pelo tecido adiposo diminui. A lipólise e a oxidação de ácidos graxos são estimuladas, gerando energia.

Os três substratos-chave para a gliconeogênese são o lactato, a alanina e o glicerol

No jejum, aproximadamente 80% de toda glicose é captada pelos tecidos independentes de insulina. Dessa, 50% vão para o cérebro e 20% para os eritrócitos. Os tecidos dependentes de insulina usam relativamente pouca glicose – o músculo e o tecido adiposo juntos usam apenas 20%

de toda glicose disponível. Após 12 horas de jejum, de 65%-75% da glicose sintetizada é ainda derivada do glicogênio e o restante da gliconeogênese. Se o jejum se prolonga, a contribuição da gliconeogênese aumenta de forma constante. O músculo contribui para a gliconeogênese liberando lactato, o qual é captado pelo fígado e oxidado a piruvato antes de entrar na gliconeogênese. A glicose liberada do fígado retorna ao músculo esquelético, fechando um ciclo conhecido como ciclo de Cori (Fig. 21.13).

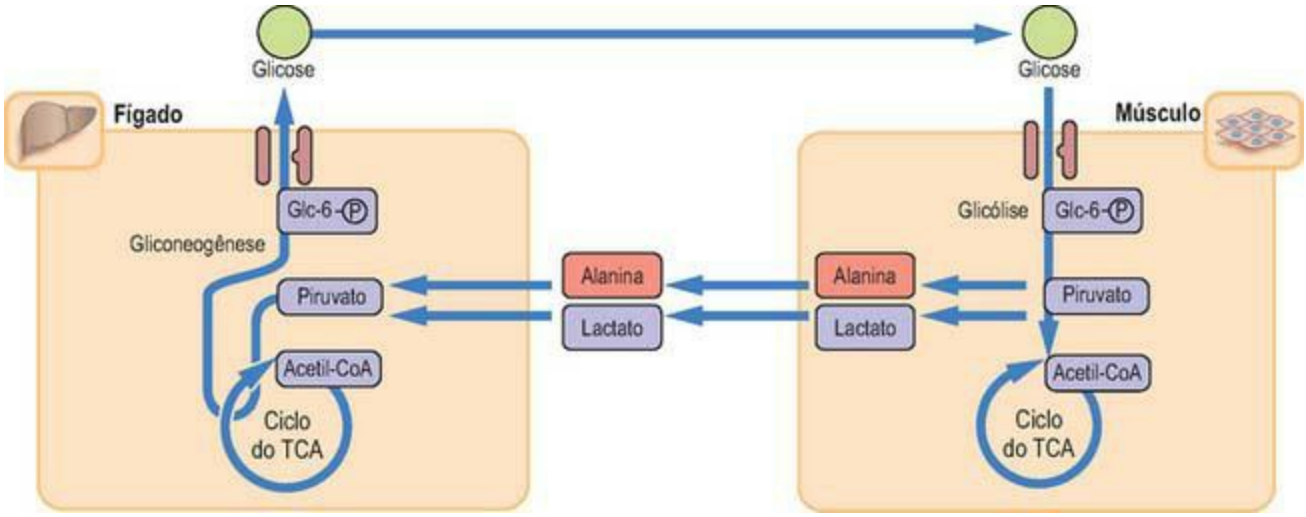


Fig. 21.13 O ciclo de Cori e o ciclo glicose-alanina. O ciclo de Cori (glicose-lactato) permite a reciclagem do lactato em glicose, mas não contribui para a síntese *de novo* de glicose. A alanina é derivada da proteólise muscular.

A baixa concentração de insulina também estimula a proteólise e leva à liberação de aminoácidos (principalmente alanina e glutamina) do músculo. A alanina liberada é captada pelo fígado e é convertida em piruvato, que entra na gliconeogênese. Esse ciclo da glicose-alanina é paralelo ao ciclo de Cori.

O glucagon estimula a hidrólise de triacilgliceróis (lipólise) pela lipase hormônio-sensível. Isso libera glicerol, que é o terceiro (depois do lactato e da alanina) maior substrato para a gliconeogênese e gera ácidos graxos. O metabolismo de ácidos graxos, por sua vez, estimula a cetogênese de acetil-CoA. A cetogênese gera os corpos cetônicos: acetoacetato, hidroxibutirato e o produto da descarboxilação espontânea do acetoacetato, a acetona. Durante o jejum prolongado, os corpos cetônicos podem ser usados como substratos energéticos no coração e no músculo esquelético.

Jejum prolongado (inanição)

A inanição é um estado crônico de baixa insulina e elevado glucagon. Existe também um decréscimo na concentração de hormônio tireoidiano, que diminui a velocidade metabólica. Os ácidos graxos são agora os maiores substratos energéticos. Como a gliconeogênese utiliza oxaloacetato, um metabólito do ciclo do TCA, sua concentração na mitocôndria cai; isso limita a atividade do ciclo do TCA (Cap. 14). A desaceleração do ciclo leva ao acúmulo de acetil-CoA proveniente da β-oxidação de ácidos graxos. A acetil-CoA é canalizada para a cetogênese e a concentração plasmática de corpos cetônicos aumenta.

Vários mecanismos durante a inanição minimizam a necessidade de síntese de glicose de proteínas do corpo

Durante a inanição, a gliconeogênese ocorre tanto no fígado quanto no rim. A proteólise muscular aumenta, levando à liberação de alanina e glutamina. Entretanto, a utilização de proteínas do corpo como substratos para a gliconeogênese está minimizada pela quase total dependência de gordura como fonte de energia (Fig. 21.14). Além disso, o ciclo de Cori diminui a necessidade de produção de glicose endógena, e a quantidade do transportador GLUT-4 nos tecido adiposo e no músculo diminui, "poupando" mais glicose. Por fim, o cérebro também se adapta a usar corpos cetônicos como combustíveis. Algum tecido cerebral realmente troca a completa oxidação de glicose pela glicólise.

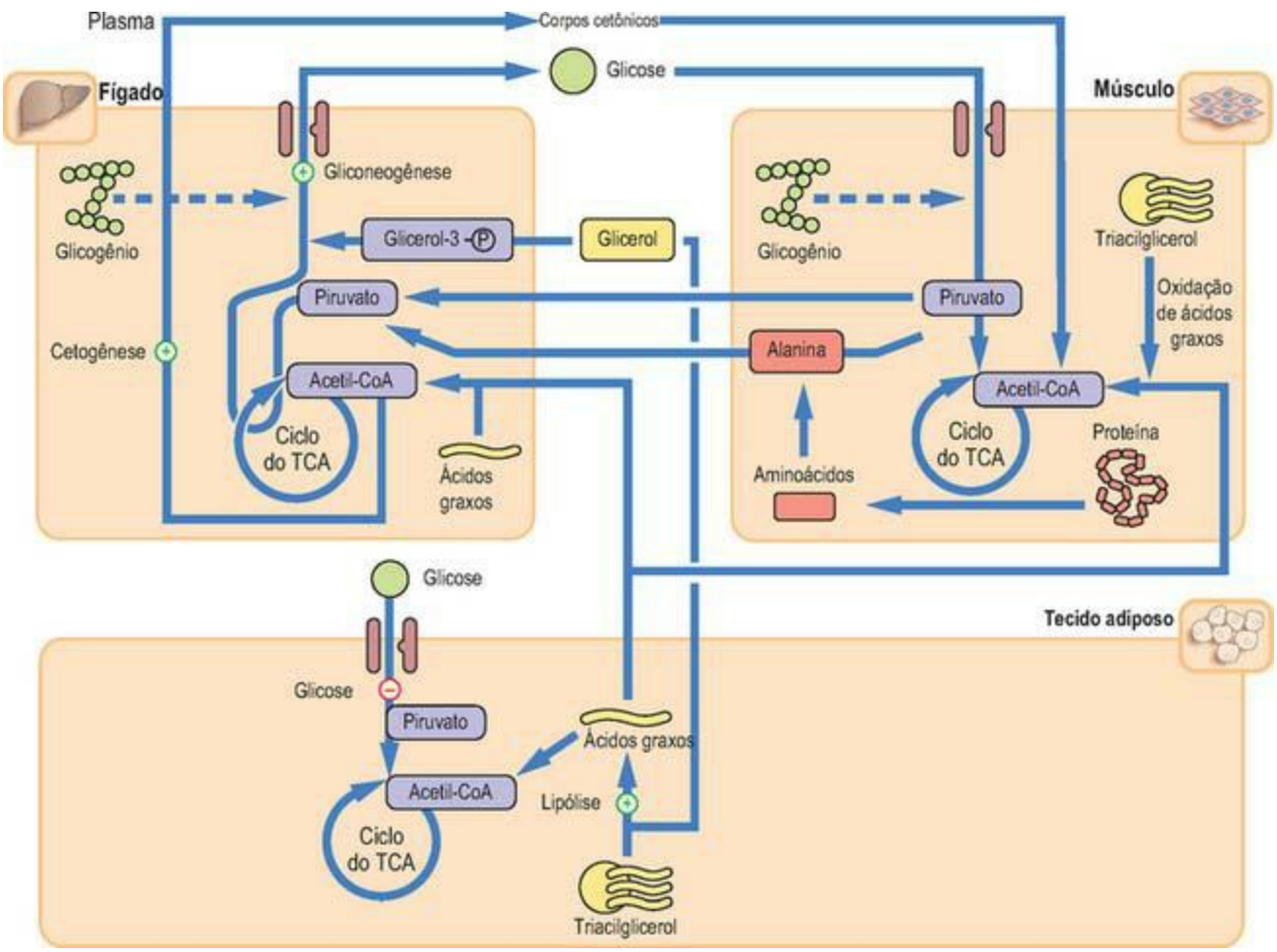


Fig. 21.14 Metabolismo durante o jejum prolongado (inanição). A direção do metabolismo é similar à quela do jejum mediano, mas existem respostas adaptativas em operação. Os estoques de glicogênio estão esgotados. O fornecimento de combustíveis

metabólicos depende da gliconeogênese e da lipólise. Os corpos cetônicos produzidos da acetil-CoA tornam-se uma importante fonte de energia para o músculo, e o cérebro também se adapta a utilizá-los. De forma importante, uma diminuição na demanda por glicose (e, portanto, a gliconeogênese) poupa as proteínas musculares.

METABOLISMO DURANTE O ESTRESSE

A resposta ao estresse é direcionada pelos hormônios anti-insulínicos

Esse tipo de resposta metabólica não ocorre apenas durante as reações de "luta e fuga", mas é também disparado por trauma, queimaduras, cirurgias e infecções. Ele está associado ao hipermetabolismo. O sistema nervoso simpático desempenha o papel principal no seu desenvolvimento. A resposta metabólica é direcionada pelos hormônios anti-insulínicos: catecolaminas, principalmente epinefrina (Fig. 13.5), glucagon e cortisol. A resposta metabólica ao estresse inclui a supressão de vias anabólicas (síntese de glicogênio, lipogênese), catabolismo aumentado (glicogenólise, lipólise e proteólise) e captação independente de insulina de glicose periférica (Fig. 21.15). Clinicamente, existe vasoconstricção inicial, com o intuito de limitar uma possível perda de sangue. Ocorre também febre, taquicardia, taquipneia (velocidade respiratória aumentada) e leucocitose (aumento do número de células brancas sanguíneas).

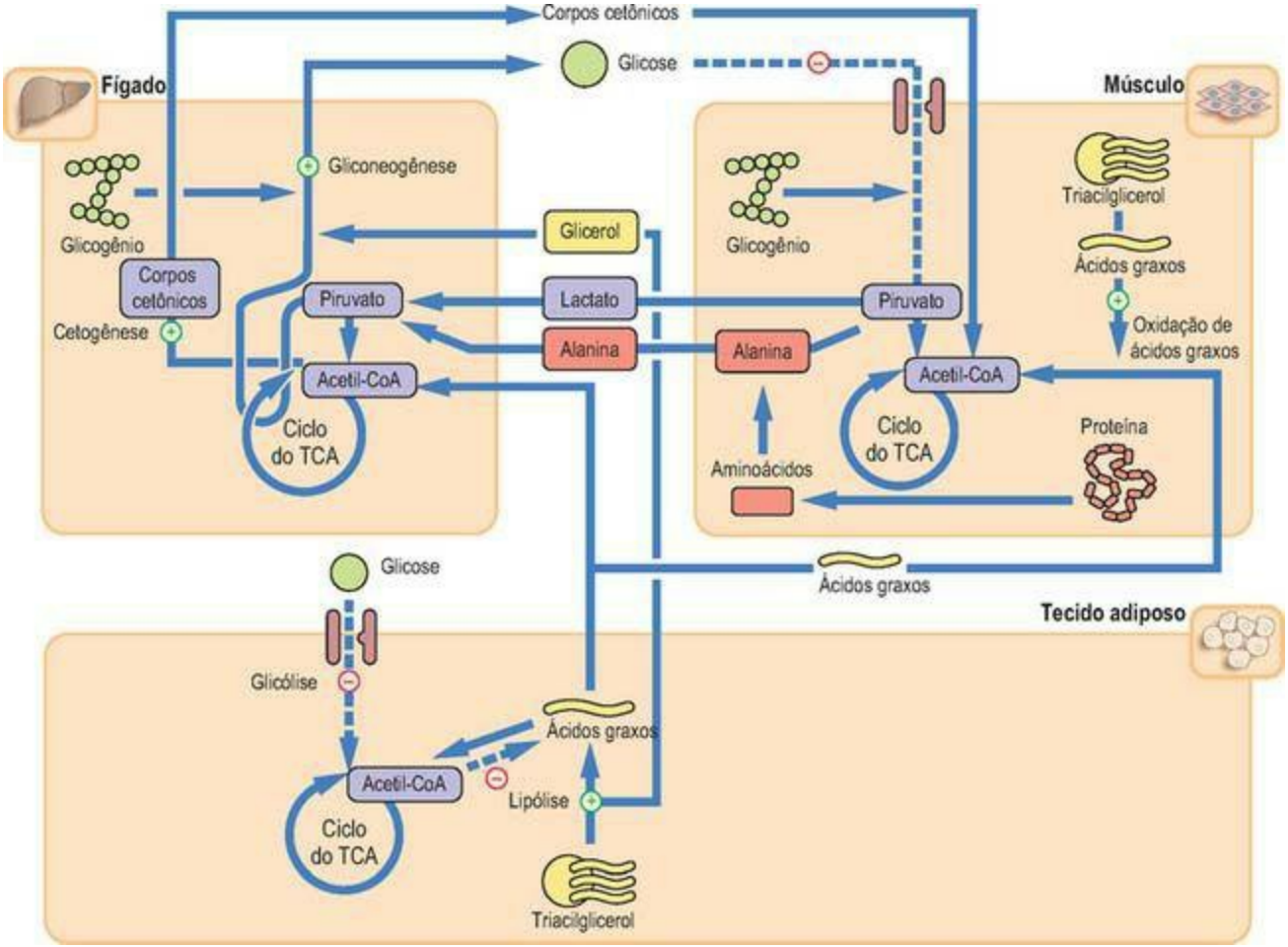


Fig. 21.15 Metabolismo durante o estresse e a lesão. A resposta ao estresse é catabólica e amplamente análoga ao jejum. A glicose é mobilizada de todas as fontes disponíveis. A epinefrina tem um papel-chave e, junto com o glucagon, inibe a secreção de insulina. O efeito dos hormônios anti-insulínicos prevalece. O estresse também induz resistência periférica à insulina, poupando glicose. A energia é fornecida da glicose, dos ácidos graxos e do catabolismo de proteínas.

A resposta ao estresse garante o fornecimento de glicose por meio da glicogenólise e da gliconeogênese

Durante a resposta ao estresse, os substratos energéticos são mobilizados de todas as fontes disponíveis. A prioridade é fornecer glicose para o cérebro: a epinefrina e o glucagon estimulam a glicogenólise e a gliconeogênese. Além disso, a captação periférica de glicose diminuída resulta em mais glicose disponível para o cérebro. Posteriormente, a velocidade metabólica aumenta e os ácidos graxos tornam-se a maior fonte de energia. As proteínas musculares fornecem aminoácidos para a gliconeogênese; isso leva a um balanço nitrogenado negativo dentre dois a três dias após a lesão.

O estresse induz a resistência à insulina

O transporte de glicose dependente de insulina para as células, mediado por GLUT-4, diminui. Os hormônios glicocorticoides contribuem para isso. Eles também facilitam a estimulação da gliconeogênese pelo glucagon e das catecolaminas pela indução dos genes da Glc-6-Pase, e da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (Tabela 21.2). Ao mesmo tempo, a captação de glicose independente de insulina aumenta, particularmente no músculo. Isso é mediado pelo fator de necrose tumoral α (TNF-α) e outras citocinas como a interleucina-1 (IL-1) (Cap. 43). O TNF- α também estimula a degradação de glicogênio muscular. As citocinas, como a IL-6, ajudam induzir PEPCK, estimulam a lipólise no tecido adiposo e contribuem para a proteólise muscular. Ocorre um aumento na produção de lactato.

A resposta ao estresse afeta os resultados de exames de laboratório

A resposta metabólica ao estresse afeta os resultados de exames comuns de laboratório. Um achado-chave é a hiperglicemia; durante o estresse, não deve ser confundida com o diabetes melito. Além disso, lesão, infecção e trauma estão associados à chamada resposta de fase aguda, durante a qual uma variedade de proteínas, tais como a α_1-antitripsina, a proteína C reativa (CRP), a haptoglobina, a α_1-glicoproteína ácida, as proteínas do complemento e outras estão aumentadas. As dosagens de CRP são importantes no monitoramento do progresso do tratamento em pacientes com infecções graves (Cap. 4).

DIABETES MELITO

O diabetes é uma desordem do metabolismo energético caracterizada por hiperglicemia e dano vascular

Existem dois componentes principais para a síndrome do diabetes melito: a hiperglicemia e as complicações vasculares. O diabetes é cada vez mais comum: o número de pessoas com diabetes mundialmente aumentou de 30 milhões em 1985 para mais de 170 milhões, e a OMS prevê que esse número alcançará 300 milhões em 2025. A estimativa da Federação Internacional de Diabetes é ainda maior, de 380 milhões. Existem aproximadamente 440.000 crianças com diabetes tipo 1 no mundo e o diabetes tipo 2 afeta aproximadamente 5% da população dos países desenvolvidos (Tabela 21.4).

Tabela 21.4 Classificação do diabetes.

Classificação do diabetes	
Síndrome	**Comentários**
Tipo 1	destruição autoimune das células β
Tipo 2	resistência à insulina e deficiência da célula β
Outros tipos	defeitos genéticos das células β (p. ex., mutações do gene da glicoqui-nase). Sindrome de resistência à insulina rara
	doenças do pâncreas exócrino. Doenças endócrinas (acromegalia, síndrome de Cushing). Drogas e diabetes induzida guimicamente, infecções (p. ex., caxumba).
	síndromes raras com a presença de anticorpos antirreceptores.

	Diabetes acompanhando outras doenças genéticas (p. ex., síndrome de Down))
Diabetes gestacional	qualquer grau de intolerância à glicose diagnosticada na gestação

O diabetes tipo 1 era descrito anteriormente como diabetes dependente de insulina (IDDM) e o tipo 2 como diabetes independente de insulina (NIDDM) ou diabetes de início na maturidade. Aproximadamente 90% de todos os pacientes diabéticos têm diabetes do tipo 2.

Existem várias formas de diabetes melito

Existem quatro formas principais de diabetes melito: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes secundária e diabetes gestacional (GDM, diabetes da gravidez). O tipo mais comum é a diabetes tipo 2: 90% de todos os pacientes diabéticos têm diabetes tipo 2 e 5-10% têm o tipo 1. As duas outras formas são, em comparação, raras (Tabela 21.4). O diabetes tem um forte componente genético, mas isso é frequentemente mascarado por fatores relacionados ao estilo de vida. É importante ressaltar que alguns pacientes diabéticos não apresentam quaisquer sintomas. Nesses indivíduos, o diagnóstico somente é realizado por meio de resultados de laboratórios.

O diabetes causa alterações nas paredes das artérias pequenas (microangiopatia) e grandes (macroangiopatia), induzidas por uma combinação de estresse oxidativo, formação excessiva de produtos finais (AGE) de glicosilação não enzimática avançada (glicoxidação) e fluxo aumentado de substratos pela via poliol (ver a seguir). A microangiopatia renal (nefropatia diabética) leva à falência renal (quadro da pág. 317), o desenvolvimento de microangiopatia na retina (retinopatia diabética) pode causar cegueira e a que ocorre no sistema nervoso (neuropatia diabética) leva ao prejuízo da função nervosa autônoma. Os pacientes diabéticos também desenvolvem opacidade do cristalino (cataratas). O diabetes é a principal causa de cegueira no mundo ocidental e uma das maiores causas de falência renal.

A microangiopatia diabética está associada a um risco de duas a três vezes maior de infarto do miocárdio do que em relação a pessoas não diabéticas de idade similar. A microangiopatia que afeta as artérias periféricas leva à doença vascular periférica diabética e a ulcerações nos pés: o diabetes é a principal causa de amputações nos membros inferiores. Entretanto, a complicação mais prevalente do diabetes é a doença cardiovascular. Essa também é a maior causa de morte entre pessoas com diabetes tipo 2.

Diabetes tipo 1

O diabetes tipo 1 geralmente se desenvolve em pessoas com idade inferior a 35 anos, com um pico de incidência aproximadamente aos 12 anos de idade. Ele é causado por destruição autoimune das células β pancreáticas. Sua causa prematura ainda não está esclarecida, poderia ser uma infecção viral, toxinas ambientais ou alimentação. A reação autoimune poderia ser iniciada pela resposta de citocina à infecção. Além da infiltração inflamatória das ilhotas, uma parte dos pacientes apresenta anticorpos circulantes contra várias proteínas das células β, que podem aparecer anos antes do diagnóstico. Os autoanticorpos para insulina, descarboxilase do ácido glutâmico e proteína tirosina fosfatase têm sido também observados.



GLICOSE PLASMÁTICA APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO

Uma mulher de 66 anos de idade foi admitida na enfermaria da cardiologia com dor no peito. Foi diagnosticado infarto do miocárdio com base no eletrocardiograma e na concentração plasmática de troponina aumentada. Ela foi tratada com sucesso por meio de trombólise. Naquele momento, seu nível de glicose plasmática casual estava em 10,5 mmol/L (189 mg/dL). No dia seguinte, a glicemia em jejum estava apenas sutilmente elevada (7,5 mmol/L (117 mg/dL)). A glicose plasmática em jejum normal é <6,1 mmol/L.

Comentário. O estresse intenso associado ao infarto do miocárdio está relacionado com a resposta dos hormônios contrarregulatórios que leva à elevação da concentração de glicose sanguínea. É necessário cuidado na interpretação dos níveis de glicose em jejum em contexto de doença aguda. O teste de tolerância à glicose não deve ser realizado durante doença aguda.



UM ESTRESSE INTENSO AFETA O METABOLISMO HÍDRICO E ELETROLÍTICO

Uma mulher de 65 anos de idade foi submetida a uma gastrectomia parcial. Após a cirurgia ela foi submetida à reposição intravenosa padrão de fluido. O volume de fluidos a ser reposto foi calculado com base no fluido perdido na urina por meio da drenagem gástrica e foi incluído um desconto da perda inconsciente (perda de água pela respiração e o suor). Apesar desse cálculo cuidadoso do volume de fluido administrado e de uma função renal normal, a paciente desenvolveu hiponatremia e tornou-se clinicamente sobrecarregada de fluido.

Comentário. A resposta ao estresse, como em uma cirurgia importante, inclui a estimulação da secreção de vasopressina da pituitária posterior. Isso aumenta a reabsorção de água pelos rins e causa retenção de água, a qual necessita ser levada em conta quando se prescreve a terapia de fluido no período pós-operatório (Caps. 22 e 23). O surgimento rápido de hiponatremia pode causar convulsões ou coma devido ao edema cerebral.

A suscetibilidade ao diabetes do tipo 1 parece ser hereditária. Um irmão de um paciente com diabetes tipo 1 tem uma chance de 10% de desenvolvimento de diabetes na idade de 50 anos. Os genes de suscetibilidade estão localizados no cromossoma 6 no complexo principal de

histocompatibilidade (MHC, Cap. 38). Aproximadamente 50% da suscetibilidade genética ao diabetes reside nos genes HLA: os genótipos HLA DR e DQ, e em menor grau em outros *loci* conhecidos como IDDM2 (insulina-VNTR) e IDDM12 (CTLA-4), estão ligados ao diabetes. Têm sido identificados genes, dentro do complexo HLA, que proporcionam risco e genes que concedem proteção. É interessante notar que essa região também contém os genes de suscetibilidade associados a outras doenças autoimunes: isso significa que os pacientes com diabetes tipo 1 são mais suscetíveis a outras desordens autoimunes tais como a doença de Graves, doença de Addison e doença celíaca. Indivíduos com diabetes tipo 1 são propensos ao desenvolvimento de cetoacidose e são dependentes do tratamento com insulina.

Diabetes tipo 2

O diabetes tipo 2 geralmente se desenvolve em pacientes obesos com mais de 40 anos de idade. Sua patogênese envolve a combinação de resistência à insulina com a diminuição de sua secreção.

Existe um forte componente hereditário para o diabetes tipo 2. Os gêmeos monozigóticos são de 90% a 95% concordantes para o diabetes, e os parentes de primeiro grau de pessoas diabéticas têm uma chance de 40% de desenvolvimento da doença. Em contrapartida, nas pessoas com nenhum parente diabético esse risco é de somente 10%. Em 2007, um estudo genômico amplo definiu aproximadamente 70% do risco genético para o diabetes tipo 2. Os genes identificados incluem o gene TCF7L2, previamente conhecido, e quatro outros, sendo o mais importante o SLC30AS, um gene, de certa forma surpreendentemente, que codifica um transportador de zinco.

Existe também uma rara forma autossômica dominante de diabetes tipo 2 conhecida como diabetes da maturidade desenvolvida no jovem (MODY). O MODY resulta de mutações em pelo menos seis genes diferentes: entre eles estão a enzima glicoquinase (MODY2) e vários fatores de transcrição (p. ex., o fator nuclear de hepatócito HNF-4α (MODY1) e HNF-α_1 (MODY3)). Há também uma mutação do DNA mitocondrial que leva ao prejuízo da fosforilação oxidativa e à chamada diabetes mitocondrial. Para complicar ainda mais, cerca de 10% dos pacientes diagnosticados para diabetes tipo 2 também têm autoanticorpos para a descarboxilase do ácido glutâmico; esses são indivíduos que efetivamente estão desenvolvendo uma forma de diabetes do tipo 1, algumas vezes chamada diabetes autoimune latente do adulto (LADA).

No diabetes tipo 2, a cetoacidose é rara. Os pacientes podem desenvolver complicações microvasculares como no tipo 1, mas o principal problema são as complicações macrovasculares, que por fim levam a doença coronariana, doença vascular periférica e derrame. A obesidade é o principal fator para o desenvolvimento de diabetes tipo 2. Os diabetes tipo 1 e tipo 2 são comparados na Tabela 21.5.

Tabela 21.5 Comparação entre os diabetes tipo 1 e tipo 2.

Comparação entre os diabetes tipo 1 e tipo 2		
	Tipo 1	**Tipo 2**
Início	geralmente antes dos 20 anos de idade	geralmente acima dos 40 anos de idade
Síntese cle insulina	ausente: destruição imune das células β	preservada: combinação de resistência à insulina e função de células β diminuída
Concentração plasmática de insulina	baixa ou ausente	baixa, normal ou elevada
Suscetibilidade genética	sim	sim
Anticorpos contra as células das ilhotas no diagnóstico	sim	não
Obesidade	incomum	comum
Cetoacidose	sim	rara – pode ser precipitada por urn maior estresse metabólico
Tratamento	insulina	drogas hipoglicêmicas e insulina

Metabolismo no diabetes

No diabetes tipo 1, a glicose não pode entrar nas células dependentes de insulina, tais como os adipócitos e os miócitos, devido à falta de insulina. A glicólise e a lipogênese estão inibidas, enquanto a glicogenólise, a lipólise, a cetogênese e a gliconeogênese estão estimuladas pelo glucagon (Fig. 21.16). O fígado torna-se um órgão produtor de glicose. Isso, combinado com o transporte de glicose diminuído, leva à hiperglicemia de jejum. Quando a concentração plasmática de glicose excede a capacidade de reabsorção renal, a glicose aparece na urina. Como a glicose é osmoticamente ativa, sua excreção é acompanhada pela perda de água aumentada (diurese osmótica). Os pacientes diabéticos mal controlados urinam grandes volumes (poliúria) e bebem muito líquido (polidipsia). A perda de líquido por fim leva à desidratação (Cap. 23).

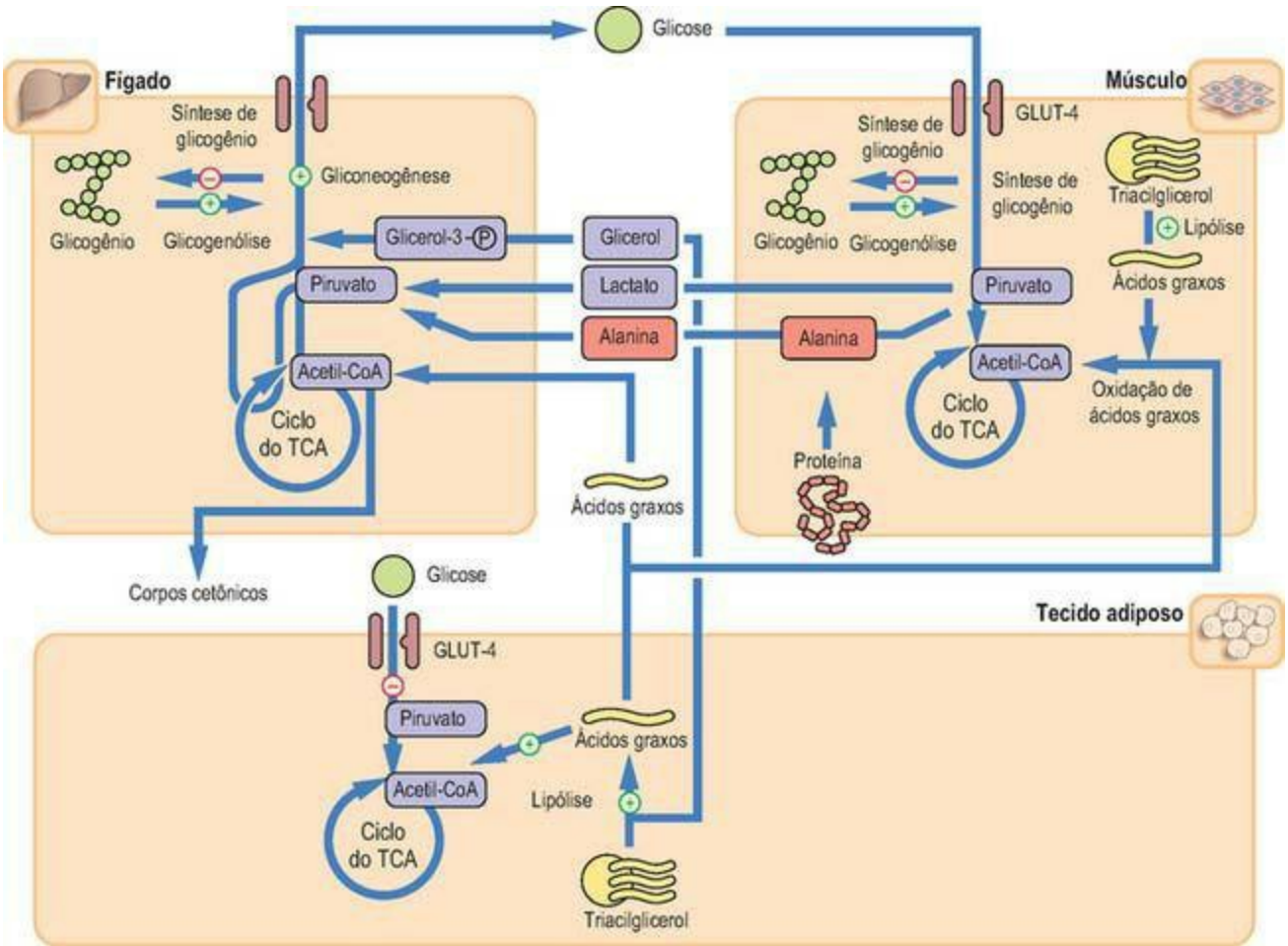


Fig. 21.16 Metabolismo no diabetes melito. Há uma habilidade diminuída dos tecidos para utilizarem glicose devido à falta de insulina ou a uma ação defeituosa da insulina. A hiperglicemia é causada pelo efeito combinado da captação periférica da glicose diminuída e da gliconeogênese hepática aumentada. Note que o excesso de ácidos graxos disponíveis para o fígado, junto com o ciclo do TCA menos eficiente devido à utilização do oxaloacetato pela gliconeogênese, resulta no acúmulo de acetil-CoA e sua conversão em corpos cetônicos.

Em paralelo ao distúrbio no balanço hídrico, a lipólise gera um excesso de acetil-CoA, que entra na cetogênese. A concentração de corpos cetônicos no plasma aumenta (cetonemia) e estes são excretados na urina (cetonúria). A superprodução dos ácidos acetoacético e β-hidroxibutírico aumenta a concentração sanguínea do íon hidrogênio (decréscimo do pH). Isto se configura uma

acidose metabólica (Cap. 24) conhecida por cetoacidose diabética (Fig. 21.17). Em alguns pacientes, a acetona pode ser percebida no hálito.

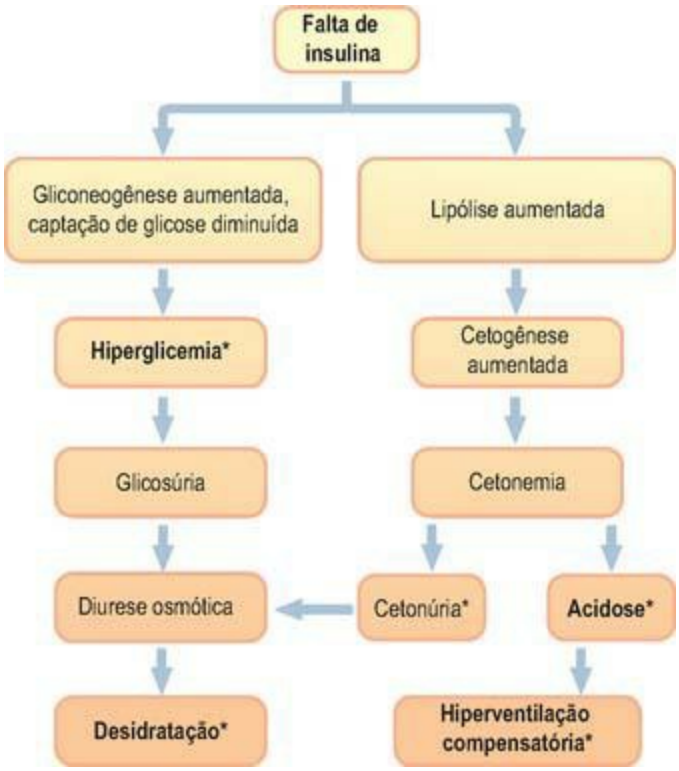


Fig. 21.17 **Cetoacidose diabética.** A figura clínica da cetoacidose é a consequência da falta de insulina e a resultante hiperglicemia e suas complicações (diurese osmótica, desidratação), aumento da lipólise e da cetogênese (cetonemia e acidose). O tratamento da cetoacidose é planejado para combater esses problemas e inclui a infusão de insulina, a reidratação e a suplementação com potássio. *Indica os achados clínicos e laboratoriais mais importantes.

A cetoacidose é a maior complicação aguda do diabetes mal controlado

As características-chave da cetoacidose diabética são hiperglicemia, cetonúria, desidratação e acidose metabólica. A cetoacidose diabética pode se desenvolver rapidamente, algumas vezes após a pessoa esquecer de uma única dose de insulina. A cetoacidose se desenvolve predominantemente em pessoas com diabetes do tipo 1 que possuem muito pouca ou nenhuma insulina no plasma e, consequentemente, uma razão insulina-glucagon muito baixa. Isso é raro no diabetes tipo 2, mas pode ocorrer após um estresse importante, tal como o infarto do miocárdio. Se não for tratada, a cetoacidose se torna uma ameaça à vida do paciente.

Note que existem similaridades substanciais entre o metabolismo no estado de jejum e no diabetes; é por isso que ele foi descrito como "fome em meio à abundância". Entretanto, enquanto o jejum leva a uma cetonemia moderada, no diabetes o acúmulo de grandes quantidades de corpos cetônicos por fim causa cetoacidose diabética.

A hipoglicemia é a complicação mais comum do diabetes

É válido recordar que a complicação aguda mais comum do diabetes não é a cetoacidose, e sim a hipoglicemia. Ela ocorre no diabetes tipo 1 e no tipo 2. Ela se desenvolve como um resultado do desequilíbrio entre a dose de insulina, o fornecimento de carboidrato e a atividade física. Portanto, a hipoglicemia pode ocorrer após a administração de muita insulina ou pela perda de uma refeição. É importante ressaltar que, como o exercício aumenta a captação de glicose pelos tecidos independentes de insulina, os pacientes diabéticos devem diminuir as suas doses de insulina antes do

exercício vigoroso para prevenir a hipoglicemia. A hipoglicemia moderada pode ser controlada pela ingestão de uma bebida adocicada ou de alguns cubos de açúcar. A hipoglicemia grave, entretanto, é uma emergência médica que requer tratamento com glicose intravenosa ou com a injeção intramuscular de glucagon.

O caminho da obesidade até o diabetes tipo 2

No diabetes tipo 1, o desenvolvimento de doença clínica pode acontecer rápido e a acidose diabética pode ser sua primeira apresentação. O desenvolvimento do diabetes tipo 2 é mais lento e forma uma continuidade que inclui obesidade e resistência à insulina.

Os dois fatores de risco mais importantes para o diabetes tipo 2 são o histórico familiar e a obesidade. O histórico familiar reflete a base genética. A obesidade está intimamente relacionada à resistência à insulina. A resistência à insulina primeiro se apresenta como hiperinsulinemia com concentração de glicose normal. Quando as concentrações aumentadas de insulina são insuficientes para compensar a resistência tecidual, a concentração plasmática de glicose pode aumentar sutilmente no jejum (essa condição é conhecida como glicose alterada em jejum, IFG) ou em resposta a uma carga de glicose (tolerância à glicose diminuída, IGT). Tanto a IFG quanto a IGT são sinais preditores de diabetes e a IGT está associada a um risco de complicações macrovasculares aumentado. O posterior aumento na resistência à insulina e a consequente diminuição da secreção de insulina levam à manifestação de diabetes tipo 2. A importância de estar ciente da continuidade descrita é que o processo pode ser desacelerado ou, ocasionalmente, revertido pela perda de peso e exercício. Portanto, o aparecimento de IFG ou IGT deve ser um forte sinal para a mudança de estilo de vida para minimizar a chance de manifestação do diabetes mais tarde.



CETOACIDOSE DIABÉTICA IMPREVISTA

Uma menina de 15 anos de idade, que não sabia ter diabetes, foi admitida no departamento de acidente e emergência. Ela estava confusa e seu hálito tinha um odor de acetona. Ela apresentava sinais de desidratação com redução de turgor tecidual e língua seca. Ela também apresentou respiração rápida e sem pausas. Sua glicemia era 18,0 mmol/L (324 mg/dL) e cetonas estavam presentes na urina. A concentração sérica de potássio era de 4,9 mmol/L (normal: 3,5-5,0 mmol/L) e o pH do sangue arterial era de 7,20 (normal: 7,37-7,44).

Comentário. Esta é uma típica apresentação de cetoacidose diabética. A hiperventilação é uma resposta compensatória para a acidose (Cap. 24). A cetoacidose diabética é uma emergência médica. A paciente recebeu infusão intravenosa contendo solução salina fisiológica com suplemento de potássio para repor a perda de fluido e uma infusão de insulina. É digno de nota que uma proporção substancial de crianças apresenta cetoacidose no momento do diagnóstico.

Obesidade, diabetes e hipertensão estão ligados à doença cardiovascular

A obesidade, a resistência à insulina e a intolerância à glicose podem ser acompanhadas por dislipidemia (Cap. 18) e por aumento da pressão arterial (hipertensão arterial). Essas características agrupadas são descritas como a síndrome metabólica. Ela está associada (assim como a obesidade) com uma inflamação de baixo grau que afeta a vasculatura (Cap. 18) e com uma tendência aumentada à trombose (estado hipercoagulável, Cap. 7). É importante apontar que nesta síndrome também se caracteriza um aumento do risco de doença cardiovascular.

A síndrome metabólica não é uma condição clínica – é um conceito formulado para aumentar a atenção dos médicos para os múltiplos riscos cardiovasculares. A procura por um possível denominador comum para todos os fatores de risco envolvidos continua; cada vez mais há a concepção de que o diabetes e a doença cardiovascular podem apresentar aquilo que alguns pesquisadores denominam "solo comum". As relações entre obesidade, diabetes e aterosclerose estão ilustradas na Figura 21.18.

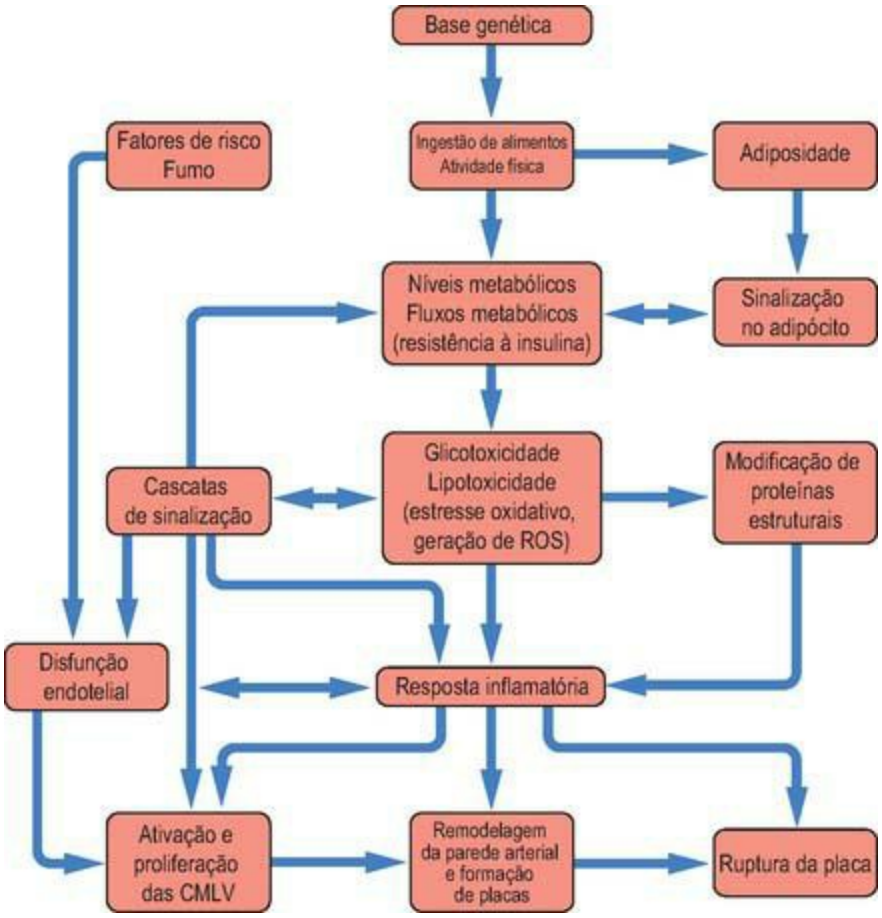


Fig. 21.18 Relações entre obesidade, intolerância à glicose, diabetes e aterosclerose. Na obesidade, a atividade endócrina do tecido adiposo aumentado é importante no desenvolvimento da resistência à insulina, intolerância à glicose e diabetes tipo 2. A resposta inflamatória de baixo grau e o estresse oxidativo aumentado podem ser induzidos pela obesidade e também pelos fatores de risco cardiovasculares clássicos. Isso resulta em dano endotelial e no início da aterosclerose. Uma vez o diabetes estando presente, a glicosilação de proteínas e a formação dos produtos finais da glicosilação avançada (glicoxidação) contribuem ainda mais para o dano vascular.

O estresse oxidativo, os produtos finais da glicosilação não enzimática avançada (glicoxidação) e a atividade da via poliol contribuem para o desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes

A toxicidade da glicose no diabetes é devida em particular ao seu envolvimento em reações que geram espécies reativas de oxigênio (ROS; Cap. 37). Na presença de metais de transição tais como o cobre, a glicose sofre auto-oxidação. Isso gera ROS. A glicose também se liga não enzimaticamente a resíduos de lisina e de valina em proteínas teciduais e plasmáticas em um processo chamado de glicosilação não enzimática de proteínas (Fig. 21.19). Quando a glicose interage com uma proteína, primeiro forma um composto lábil conhecido como uma base de Schiff. Esta, pelo chamado rearranjo de Amadori, se transforma espontaneamente em uma cetoamina. O produto de Amadori mais amplamente estudado é a hemoglobina glicosilada (hemoglobina A_{1c}, HbA_{1c}). Outras proteínas tais como a albumina, colágeno e apolipoproteína B também sofrem glicosilação não enzimática. A glicosilação não enzimática afeta a função das proteínas, como também suas ligações a receptores de membrana. Por exemplo, a glicosilação não enzimática da apoplipoproteína B inibe a captação celular das partículas de LDL (Cap. 18).

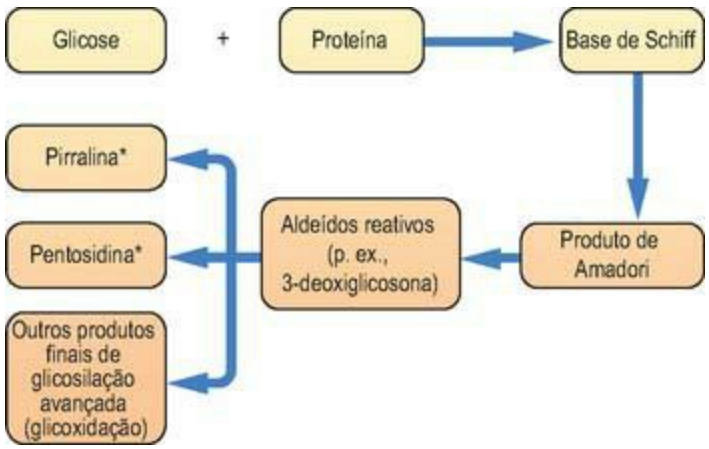


Fig. 21.19 Modificações de proteínas pela glicose: a reação de Maillard. A glicosilação não enzimática, dependente da concentração entre glicose e proteínas, modifica a estrutura e a função das proteínas afetadas. As proteínas glicosiladas (produtos de Amadori) são substratos para a formação de produtos finais da glicosilação avançada (glicoxidação) (AGE). Também o metabolismo da glicose por meio da glicólise para triose fosfatos e pela via do poliol podem gerar compostos ativos como o metoxiglioxal e a 3-desoxiglicosona, que são precursores de AGE. A produção em excesso desses compostos é responsável em um alto grau pela toxicidade da glicose observada no diabetes (compare com a Figura 44.6).

Além de oxidação, rearranjos, desidratação e fragmentação posteriores dos produtos de Amadori levam à formação de uma família de compostos conhecidos como produtos finais da glicosilação não enzimática (glicoxidação) avançada (AGE). Isso também gera compostos com grupos carbonil quimicamente ativos, tais como 3-desoxiglicosona, glioxal e metilglioxal (Figs. 21.19 e 44.6). Alguns dos AGE são na verdade ligações proteicas cruzadas que se formam, por exemplo, no colágeno ou na mielina, diminuindo a elasticidade dessas proteínas. A concentração de AGE normalmente aumenta com a idade, mas no diabetes o seu acúmulo é mais rápido em qualquer idade. Os AGE ligam-se a seus receptores de membrana nas células endoteliais e isso gera estresse oxidativo. Isso causa danos à s células endoteliais e estimula a via pró-inflamatória envolvendo o

fator de transcrição NFκB. O NFκB, por sua vez, controla a expressão de várias citocinas inflamatórias, tais como TNFα, IL-1β e IL-6. O resultado é inflamação crônica de baixo grau, conhecida por danificar ainda mais o endotélio. A formação de AGE parece ser importante no desenvolvimento de complicações microvasculares do diabetes. O acúmulo de AGE também contribui para a aterosclerose. Eles podem estar envolvidos na patogênese de outras doenças relacionadas com a idade, tal como a doença de Alzheimer.

As ROS geradas durante a hiperglicemia prejudicam o relaxamento das células musculares lisas vasculares dependentes do endotélio. O óxido nítrico (ON) vasodilatador é gerado pelas células endoteliais de arginina em uma reação que utiliza NADPH. Ele é rapidamente desativado pelo superóxido, formando o radical peroxinitrito, o qual por si só caracteriza como um oxidante. As ROS também interferem em cascatas de sinalização afetando, por exemplo, a ativação de proteína quinase C. A hiperglicemia também aumenta a quantidade de doadores de prótons dentro da mitocôndria. Isso leva a uma diferença de potencial eletroquímico aumentada através da membrana mitocondrial interna e, consequentemente, à produção de ROS pela cadeia respiratória (Fig. 37.4). Tem sido sugerido que a produção mitocondrial de ROS aumentada é a causa primária de complicações do diabetes em longo prazo.

A atividade aumentada da via poliol está associada à neuropatia diabética e cataratas oculares

A hiperglicemia altera o estado redox celular pelo aumento da razão $NADH/NAD^+$ e pela diminuição da razão $NADPH/NADP^+$. Isso aumenta o fluxo de substrato para a via poliol onde a glicose é reduzida a sorbitol pela aldose redutase (AR; Fig. 21.20). De forma importante, A AR e o óxido nítrico sintase competem por NADPH (ver anteriormente). O sorbitol posteriormente é oxidado a frutose pela sorbitol desidrogenase. Como a aldose redutase tem um alto K_m para a glicose, a via poliol não é muito ativa em concentrações normais de glicose. Entretanto, durante a hiperglicemia, a concentração de glicose nos tecidos independentes de insulina (células vermelhas, nervos e cristalino) aumenta e isso ativa a via. O sorbitol, assim como a glicose, é osmoticamente ativo. Seu acúmulo no tecido ocular contribui para o desenvolvimento de cataratas do diabetes. No tecido nervoso, a alta concentração de sorbitol diminui a captação celular de outro álcool, o mioinositol: isso diminui a atividade da Na^+/K^+-ATPase de membrana e afeta a função do nervo. O acúmulo de sorbitol, juntamente com a hipóxia e o fluxo sanguíneo no nervo diminuído, contribui para o desenvolvimento da neuropatia diabética. Os processos que contribuem para as complicações em longo prazo da diabetes estão resumidos na Figura 21.21.

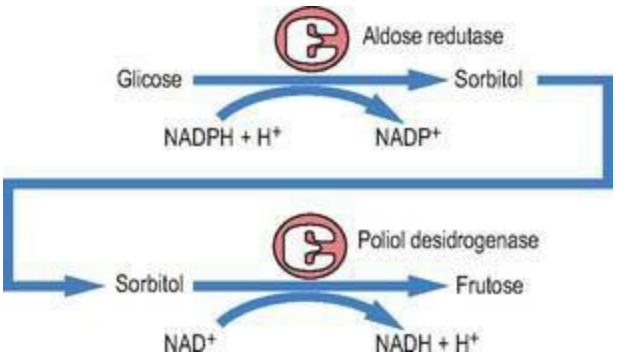


Fig. 21.20 A via do poliol. A via do poliol contribui para o desenvolvimento da neuropatia diabética que resulta da combinação de alterações teciduais vasculares e estruturais. Essa via pode ser inibida por inibidores de sua enzima limitadora da velocidade, a aldose

redutase.

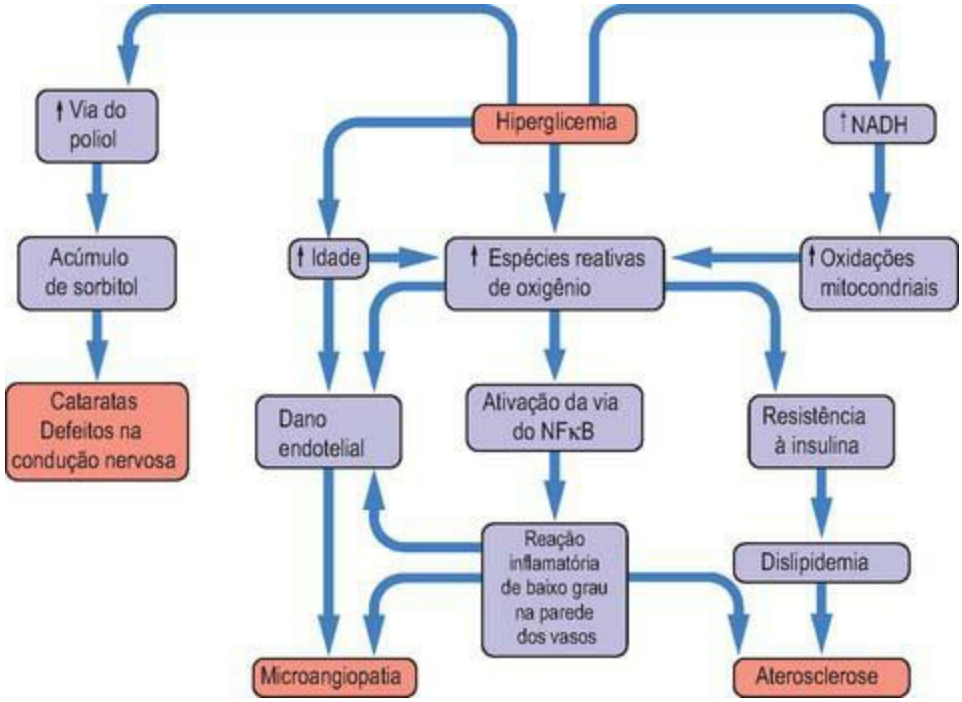


Fig. 21.21 Mecanismo de desenvolvimento de complicações microvasculares e macrovasculares do diabetes melito. O controle da glicemia está associado ao desenvolvimento de complicações microvasculares no diabetes tipo 1 e tipo 2 e ao risco cardiovascular aumentado, particularmente no diabetes tipo 2. O estresse oxidativo, a glicosilação de proteínas e a formação de produtos finais de glicosilação (glicoxidação) são os mecanismos candidatos mais importantes ao desenvolvimento de complicações microvasculares. A hiperglicemia estimula a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo aumento do fluxo de equivalentes redutores pela cadeia respiratória e pela formação de AGE, que gera ROS em diferentes estágios de seu metabolismo. A toxicidade das ROS está associada ao dano estrutural e funcional em proteínas e aos fenômenos inflamatórios induzidos por meio, por exemplo, da via do NFκB pró-inflamatório. O dano endotelial é particularmente importante. As ROS também interferem na sinalização da insulina, contribuindo para a resistência à insulina. A inflamação e a resistência à insulina são importantes no desenvolvimento de aterosclerose, causando doença macrovascular (Cap. 18). De forma importante, o estresse oxidativo aumentado e a inflamação crônica de baixo grau também têm sido observados na obesidade antes do desenvolvimento de diabetes.

AVALIAÇÃO LABORATORIAL DO METABOLISMO ENERGÉTICO E DIABETES MELITO

Os resultados de exames laboratoriais precisam estar relacionados com os ciclos alimentação-jejum descritos. O melhor momento para avaliar o metabolismo é após um jejum de 8-12 horas (no estado pós-absortivo, Fig. 21.12).

A dosagem da glicose plasmática é o teste-chave para o diagnóstico de diabetes

A dosagem da concentração plasmática de glicose é o mais importante teste laboratorial do metabolismo energético. Os médicos querem saber se a concentração de glicose está normal (normoglicemia), muito alta (hiperglicemia) e muito baixa (hipoglicemia). As concentrações de glicose aumentam após as refeições; portanto, é importante relatar o tempo de amostragem sanguínea em relação à última refeição. A concentração de glicose medida independentemente dos horários das refeições é conhecida como glicose plasmática casual. Ela ajuda a diagnosticar hipoglicemia ou hiperglicemia grave, mas é menos útil para a hiperglicemia moderada. Dois tipos de dosagens que são usadas como critérios diagnósticos para diabetes são a concentração de glicose em jejum (sem ingestão calórica por aproximadamente 10 horas) e a concentração dosada 2 horas após a ingestão oral de uma quantidade padrão de glicose.

A glicose plasmática em jejum é extraordinariamente estável. Normalmente, ela deve permanecer abaixo de 6,1 mmol/L (<110 mg/dL). As anormalidades pré-diabéticas do metabolismo de carboidratos são definidas como glicose alterada em jejum (IFG) ou tolerância à glicose diminuída (IGT). O diagnóstico de IFG é indicado pela American Diabetes Association. O diagnóstico de IGT é indicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O princípio básico por trás do critério diagnóstico para o diabetes melito é a evidência que concentrações mais altas de glicose em jejum constituem um risco para o desenvolvimento de complicações microvasculares. Esses critérios não são absolutos – eles provavelmente serão modificados à luz de pesquisas futuras.



A CETOACIDOSE DIABÉTICA AFETA O BALANÇO DE POTÁSSIO CORPORAL

A insulina aumenta a captação celular de potássio e a falta de insulina leva à liberação de potássio das células. Como o diabetes não controlado é acompanhado de diurese osmótica, o potássio liberado é excretado na urina. Como resultado, a maioria dos pacientes admitida com cetoacidose está depletada de potássio, mas, paradoxalmente, com frequência apresenta níveis de potássio plasmático normais ou aumentados. Quando a insulina exógena é administrada a tais pacientes, ela estimula a entrada de potássio nas células e pode levar a níveis de potássio plasmático muito baixos (hipocalemia). A hipocalemia é perigosa devido a seus efeitos no músculo cardíaco. Portanto, exceto para pacientes com concentrações plasmáticas muito altas, o potássio deve ser administrado durante o tratamento de cetoacidose diabética (Caps. 22 e 23).

A IGT está associada ao risco cardiovascular (o papel do fenômeno pós-prandial na aterogênese é cada vez mais reconhecido), enquanto a IFG é simplesmente um fator de risco para o desenvolvimento futuro de diabetes. A IGT é diagnosticada quando a glicose plasmática em jejum

está em uma concentração elevada após a carga de glicose. A IFG é definida como uma concentração plasmática de glicose maior do que 6,0 mmol/L, porém abaixo de 7,0 mmol/L (126 mg/dL). A glicose plasmática de 7,0 mmol/L (126 mg/dL) ou acima, se confirmada, indica diabetes. O diagnóstico laboratorial de diabetes está resumido na Tabela 21.6.

Tabela 21.6 Critérios para diagnóstico de diabetes melito e intole-rância à glicose.

Critérios para diagnóstico de diabetes melito e intolerância à glicose		
Condição	**Critério diagnóstico (mmol/L)**	**Critério diagnóstico (mg/dL) Comentários**
glicose plasmática em jejum normal	abaixo de 6,1	abaixo de 110
glicose plasmática alterada no jejum (IFG)	igual ou adma de 6,1, porém abaixo de 7,0	igual ou superiora 110, porém abaixo de 126

tolerância à glicose diminuída (IGT)	glicose plasmática após 2 h de ingestão de 75 g de glicose de 7,8 ou acima, porém abaixo de 11,1	glicose plasmática após 2 h de ingestão de 75 g de glicose de 140 ou acima, diagnosticada durante OGIT, porém abaixo de 200
Diabetes melito[*]		
critério 1	glicose plasmática casual 11,1 ou acima	glicose plasmática casual 200 ou acima[†]
critério 2	glicose plasmática em jejum 7,0 ou acima	glicose plasmática em jejum 126 ou acima
critério 3	valor de 2 h durante OGTT de 11,1 ou acima	valor de 2 h durante OGTT de 200 ou acima

[*] *Se um dos critérios é preenchido, o diagnóstico é provisório. O diagnóstico necessita ser confirmado no próximo dia usando um critério diferente*

[†] *Se é acompanhado de sintomas (poliúria, polidipsia, perda de peso sem explicação). Esses são os critérios propostos pela American Diabetes Association, 1997 (Leituras sugeridas).*

O teste de tolerância à glicose oral (OGTT) avalia a resposta da glicemia a uma carga de carboidrato

A OMS recomenda que o OGTT seja realizado em todos os indivíduos cuja glicose plasmática esteja na categoria de IFG.

É essencial que a dosagem seja realizada sob condições-padrão. O paciente deve ser atendido pela manhã, com aproximadamente 10 horas de jejum. Para evitar alterações na glicose plasmática relacionadas ao estresse ou a exercício, a pessoa deve estar sentada durante o teste. O teste não deve ser realizado durante ou imediatamente após uma doença aguda. A glicemia em jejum é medida primeiro. Em seguida, é dada ao paciente uma quantidade padrão de glicose para que ele beba (75 g em 300 mL de água) e a glicose é dosada novamente após 120 minutos (Fig. 21.22). Em alguns procedimentos a glicose é dosada mais frequentemente, por exemplo, após 20, 60 e 120 minutos. Normalmente, a glicose plasmática aumenta até um pico de concentração após cerca de 60 minutos e retorna ao nível próximo ao do estado de jejum dentro de 120 minutos. Se ela permanecer acima de 11,1 mmol/L (200 mg/dL/minutos) na amostra de 120 minutos, o paciente tem diabetes, mesmo que a glicemia em jejum esteja normal. Um paciente não diabético com a concentração de glicose após sua ingestão entre 6,1 e 7,8 mmol/L (100-140 mg/dL) apresenta IGT. A interpretação do OGTT está resumida na Tabela 21.6.

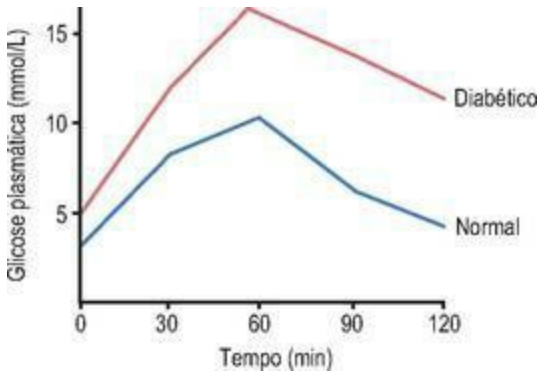


Fig. 21.22 Teste de tolerância à glicose oral (OGTT). O princípio do teste é a dosagem da concentração plasmática de glicose antes e após a ingestão oral padrão de glicose (75 g). A concentração de glicose aumenta, alcançando um pico entre 30 e 60 minutos após a ingestão. Ela deve retornar a valores próximos aos do jejum após 2 horas. Note os valores maiores de glicose plasmática em todos os pontos de tempo em um paciente diabético.

A dosagem de glicose urinária não é um exame diagnóstico para o diabetes

Em concentração plasmática normal, a glicose filtrada pelo glomérulo renal é reabsorvida nos túbulos proximais renais e nenhuma glicose aparece na urina (Cap. 23). O limite urinário para a reabsorção da glicose é de aproximadamente 10,0 mmol/L (180 mg/dL). Em concentrações plasmáticas de glicose maiores, a capacidade do sistema de transporte tubular renal é excedida, e a glicose aparece na urina (glicosúria). Note que as pessoas saudáveis podem ter um baixo limiar renal para a glicose e podem demonstrar glicosúria em níveis de glicose não diabéticos. Portanto, o diabetes não pode ser diagnosticado tomando-se como base a dosagem de glicose urinária somente.

Os corpos cetônicos na urina de uma pessoa diabética significam falta de compensação metabólica

A alta concentração de cetonas na urina (cetonúria) significa uma elevada taxa de lipólise. A cetonúria moderada ocorre em indivíduos saudáveis durante o jejum prolongado ou em uma dieta rica em gordura (Quadro no Cap. 15, p. 191). Entretanto, em um paciente diabético, a cetonúria é um importante sinal de falta de compensação metabólica, a qual necessita de ajuste no regime de tratamento.

O aumento do lactato plasmático indica oxigenação inade-quada

O nível elevado de lactato plasmático indica metabolismo anae-róbio aumentado e é um marcador de oxigenação tecidual inadequada (hipóxia; Cap. 5). Em casos extremos, tais como impedimento cardíaco, isso causa acidose grave (acidose láctica). No diabetes, as dosagens de lactato plasmático são importantes em casos raros de coma hiperglicêmico não cetônico, uma condição de risco à vida, em que os níveis plasmáticos de glicose são muito altos e ocorre desidratação extrema na ausência de cetoacidose.

A concentração média de glicose plasmática em um paciente diabético pode ser avaliada pela dosagem da concentração de hemoglobina glicosilada (glicosilação não enzimática)

Pode-se avaliar a glicemia média de um paciente por meio de múltiplas dosagens de glicose plasmática, mas isso é incômodo. A dosagem de hemoglobina glicosilada (hemoglobina A_{1c}, HbA_{1c}) torna isso muito mais fácil. A reação de glicosilação não enzimática é irreversível; portanto, a hemoglobina glicosilada permanece na circulação durante toda a vida do eritrócito. O grau de glicosilação não enzimática da hemoglobina é proporcional à concentração plasmática de glicose. A quantidade de hemoglobina glicosilada (medida como uma percentagem da hemoglobina total) reflete a concentração média de glicose (Fig. 21.23) durante quase três a seis semanas precedentes à sua dosagem. Isso é difícil de calcular precisamente porque em qualquer momento estão presentes no plasma populações de eritrócitos de idades diferentes. Valores tais como quatro a oito semanas e três a quatro meses também têm sido descritos na literatura. A exposição à glicose durante 30 dias antes da dosagem contribui com aproximadamente 50% das alterações observadas na HbA_{1c}. O valor de HbA_{1c} é utilizado como um alvo para a terapia. A concentração normal de HbA_{1c} é 4%-6%. As recomendações atuais são que em pacientes diabéticos deve-se visar atingir uma concentração de HbA_{1c} abaixo de 7% (American Diabetes Association, 2008) ou abaixo de 6,5% (Joint British

Societies, JBS, 2005). Em alguns pacientes, particularmente os idosos, isso pode ser difícil de atingir devido ao risco de hipoglicemia. Existe uma discussão em andamento entre os especialistas sobre se HbA_{1c} deve ser usada como um teste de triagem para o diabetes.

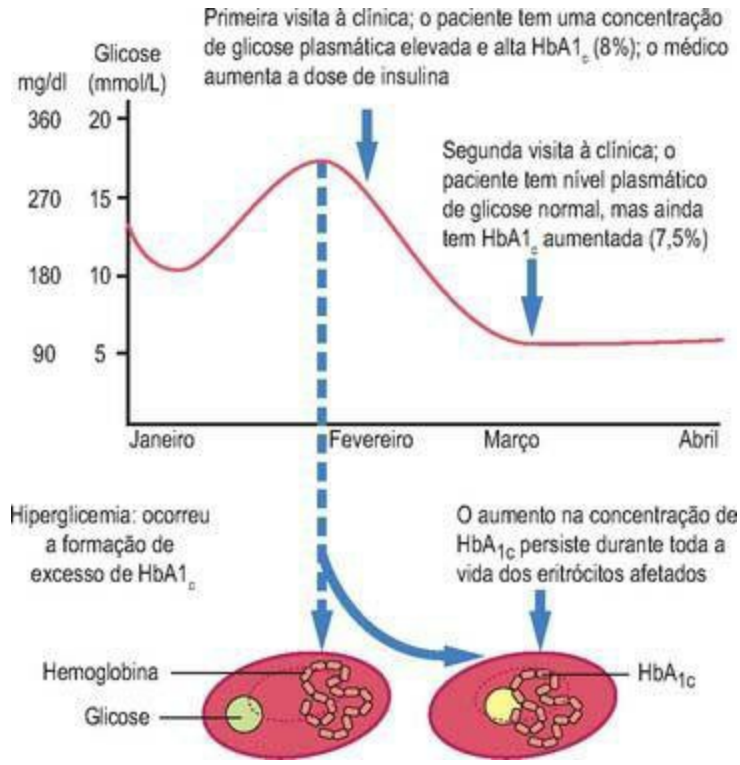


Fig. 21.23 As dosagens da hemoglobina A_{1c} refletem o tempo médio de controle da glicemia. A hemoglobina A_{1c} é a hemoglobina A modificada após a tradução por uma glicosilação não enzimática. O grau de glicosilação é proporcional à exposição da hemoglobina à glicose durante a vida de um eritrócito. A concentração de hemoglobina A_{1c} abaixo de 7% é considerada como um controle adequado da glicemia (American Diabetes Association, 2008), embora ela possa variar com o tipo de paciente e sua tendência à hipoglicemia. Para obter as concentrações de glicose em mg/dL, multiplique por 18 (quadros das págs. 54 e 289).

A excreção de albumina urinária é importante na avaliação da nefropatia diabética

O desenvolvimento de nefropatia diabética pode ser predito pela detecção de pequenas quantidades de albumina na urina (microalbuminúria). Para isso, os laboratórios empregam um método que é mais sensível do que o método convencional para a dosagem de albumina. O exame é positivo se mais do que 200 mg de albumina é excretado durante 24 horas. A concentração de proteínas na urina maior do que 300 mg/dia significa proteinúria evidente. Em pacientes diabéticos, as concentrações plasmáticas de ureia e de creatinina são também checadas rotineiramente (Cap. 23).

Avaliação periódica de um paciente diabético

Para resumir, durante a avaliação periódica de um paciente diabético, o médico deveria antes de qualquer coisa checar a glicemia e a concentração de HbA_{1c} para avaliar o controle glicêmico. Ele faria um exame dos olhos (procurando sinais de retinopatia), um exame neurológico (neuropatia) e faria um ECG (doença cardíaca coronariana). Ele deveria também dosar a ureia e a creatinina no plasma e a microalbumina/proteína na urina (nefropatia) e dosar os lipídeos plasmáticos (risco de doença cardíaca coronariana, Cap. 18).

TRATAMENTO DO DIABETES

O objetivo do tratamento do diabetes é a prevenção de complicações agudas e crônicas.

A mudança do estilo de vida é o principal pilar da prevenção do diabetes e um elemento-chave em seu tratamento

A dieta e o exercício são os fatores do estilo de vida-chave no tratamento do diabetes melito, e eles devem ser recomendados além de todos os tratamentos com drogas. Eles também são medidas preventivas essenciais para evitar ou retardar o desenvolvimento de diabetes. O programa de prevenção do diabetes demonstrou um decréscimo de 58% no desenvolvimento de diabetes tipo 2 após intervenção no estilo de vida envolvendo dieta e exercício (Leituras sugeridas). Infelizmente, menos de 20% dos pacientes que têm diabetes podem ser controlados por medidas no estilo de vida somente.

Um bom controle glicêmico previne as complicações do diabetes

A manutenção de um bom controle glicêmico é fundamental para o cuidado no diabetes. Dois grandes ensaios clínicos, o Diabetic Control and Complications Trial (DCCT), em pacientes com diabetes tipo 1, e o UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) em pacientes com diabetes tipo 2, confirmaram que as complicações microvasculares estão associadas ao nível de glicemia (Leituras sugeridas). Existem crescentes evidências que a intervenção terapêutica que inclui tanto o controle glicêmico quanto o tratamento do risco cardiovascular é ótima para a prevenção de complicações em longo prazo. Portanto, além do esforço para manter a concentração plasmática de glicose próxima do normal, é necessário o tratamento intensivo dos fatores de risco cardiovascular, tais como a hipertensão e a dislipidemia.

Os pacientes com diabetes tipo 1 são tratados com insulina

A insulina foi primeiro isolada em 1921-22 por Frederick Banting e Charles Best, que trabalhavam em Toronto (Leituras sugeridas). Em 1979, a insulina humana tornou-se a primeira proteína recombinante a ser produzida comercialmente. A insulina permanece absolutamente necessária para o tratamento de diabetes tipo 1. O tratamento envolve injeções subcutâneas diárias ao longo da vida. Diferentes tipos de insulina estão disponíveis e diferem na duração de sua ação. Análogos mais recentes de insulina humana são a insulina lispro e a insulina aspart (ação curta), e a insulina glargina (ação longa). Os pacientes geralmente tomam duas injeções subcutâneas de insulina de ação intermediária por dia ou uma mistura de insulina de ação curta e de ação intermediária. O maior desafio do tratamento com insulina é repetir os padrões de secreção de insulina diários com injeções de insulina. Injeções múltiplas de insulina de ação curta são utilizadas em casos mais difíceis. Raramente, os pacientes necessitam de uma infusão de insulina constante, liberada por uma bomba portátil programada para aumentar a velocidade de liberação nos momentos de refeição.

O tratamento de emergência da cetoacidose diabética inclui insulina, reidratação e suplementação de potássio

O tratamento de emergência da cetoacidose diabética visa quatro questões: falta de insulina, desidratação, depleção de potássio e acidose. A infusão de insulina é necessária para reverter o efeito metabólico do excesso de hormônios anti-insulínicos e a infusão de fluidos para tratar a desidratação. Os fluidos administrados normalmente contêm potássio para evitar a hipocalemia. Tal tratamento é normalmente suficiente para controlar a cetoacidose diabética; entretanto, na acidose

grave, pode ser também necessária a infusão de uma solução alcalina (bicarbonato de sódio) (caso descrito na pág. 282).

Os pacientes com diabetes tipo 2 são tratados com drogas hipoglicêmicas orais, mas podem necessitar de insulina

Os pacientes com diabetes tipo 2 podem não necessitar do tratamento com insulina porque sua síntese de insulina é, pelo menos em parte, preservada; podem ser geralmente tratados com drogas hipoglicêmicas orais. Entretanto, podem necessitar de insulina se não for obtido um controle adequado com as drogas hipoglicêmicas orais; a cada ano, 5%-10% dos pacientes tratados com drogas hipoglicêmicas orais necessitam começar o tratamento com insulina. As drogas hipoglicêmicas orais atualmente usadas visam dois mecanismos principais do desenvolvimento de diabetes tipo 2: a resistência à insulina e a secreção de insulina.

Sulfonilureias são drogas que aumentam a secreção de insulina

As sulfonilureias ligam-se a um receptor na membrana plasmática das células β pancreáticas. O receptor contém o canal de potássio sensível ao ATP. A ligação da droga fecha o canal, despolariza a membrana e abre o canal de cálcio. O aumento da concentração de cálcio citoplasmático intracelular estimula a exocitose de insulina.

A metformina diminui a resistência à insulina

A metformina, uma biguanida, é atualmente a formulação mais utilizada no tratamento do diabetes tipo 2. Ela reduz a gliconeogênese hepática, suprime os efeitos do glucagon e aumenta a sensibilidade periférica à insulina. Ela também inibe a glicogenólise por meio da inibição da atividade de glicose-6-fosfatase. A metformina aumenta a captação de glicose dependente de insulina no músculo esquelético e reduz a oxidação de ácidos graxos.

As tiazolidinedionas agem sobre o nível transcricional e diminuem a resistência à insulina

As tiazolidinedionas melhoram a utilização periférica de glicose e a sensibilidade à insulina. Elas são ligantes de PPARγ no tecido adiposo e, em menor grau, no músculo. A ativação de PPARγ aumenta a transcrição de uma série de genes responsáveis pelo metabolismo de glicose e de lipídeos, tais como aqueles que codificam o transportador de ácidos graxos aP2 (isso aumenta a captação de ácidos graxos e a lipogênese), para a lipoproteína lípase, para acil-CoA sintase e para GLUT-4. As tiazolidinedionas também ativam a via de sinalização IRS fosfoinositol quinase.

O grupo de drogas glitazar está sendo atualmente testado; eles são agentes que estimulam PPARγ e PPARα e, portanto, além da ação semelhante à das tiazolidinedionas, podem influenciar o metabolismo de lipídeos por meio do aumento de HDL e concentração plasmática de triacilgliceróis (Cap. 18).

Os hormônios intestinais e a absorção de carboidratos também são alvos de drogas antidiabéticas

Outras drogas que promovem a secreção de insulina incluem um receptor agonista do peptídio semelhante ao glucagon (GLP-1), o exenatide. GLP-1 e GIP são incretinas que estimulam a liberação de insulina dependente de glicose. O GLP-1 inibe a liberação de glucagon e está diminuído no diabetes. A enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-IV) cliva e inativa os hormônios incretinos. Os inibidores de DPP-IV, tais como a sitagliptina aumentam a secreção de insulina.

A HIPOGLICEMIA GRAVE É UMA EMERGÊNCIA MÉDICA

Um menino diabético de 12 anos de idade estava jogando com seus amigos. Ele recebeu sua injeção de insulina normal pela manhã, mas continuou a jogar na hora do almoço sem se alimentar. Ele tornou-se cada vez mais confuso e finalmente perdeu a consciência. Ele recebeu uma injeção de glucagon de um kit de emergência que seu pai portava e, então, se recuperou em minutos.

Comentário. Uma melhora após a injeção de glucagon confirma que os sintomas do menino foram causados por hipoglicemia ocasionada pela combinação de administração de insulina exógena e ingestão insuficiente de alimento. A recuperação da hipoglicemia foi devida à ação do glucagon. No hospital, os pacientes hipoglicêmicos que não podem comer ou beber são geralmente tratados com glicose intravenosa. Uma injeção intramuscular de glucagon é uma medida de emergência que pode ser aplicada em casa.

A RESISTÊNCIA À INSULINA AUMENTA O RISCO DE ATAQUE CARDÍACO

Um homem de 45 anos de idade foi encaminhado para uma clínica de cardiologia ambulatorial para investigação de desconforto no peito o qual ele sentia quando subia morros íngremes e quando estava estressado ou excitado. O paciente tinha 1,70 m de altura e pesava 102 Kg. A sua pressão sanguínea era 160/98 mmHg (acima do limite normal de 140/90 mmHg), a concentração de triglicerídeos era de 4 mmol/L (364 mg/dL) (nível desejável < 1,7 mmol/L, 148 mg/dL) e a glicose plasmática em jejum era 6,5 mmol/L (117 mg/dL). Seu ECG em repouso era normal, mas um padrão isquêmico foi observado durante o teste de exercício.

Comentário. Este homem obeso apresentava hipertensão arterial, hipertrigliceridemia e glicose alterada em jejum. A alteração da glicose em jejum nesse caso estava relacionada à resistência periférica à insulina. O agrupamento dessas anormalidades é conhecido como síndrome metabólica e leva a um risco aumentado de doença cardíaca coronariana.

A DOSAGEM DE HBA_{1C} IDENTIFICA PACIENTES QUE NÃO SEGUEM O TRATAMENTO

Um garoto de 15 anos de idade dependente de insulina visitou a clínica diabética para uma

avaliação geral de rotina. Ele relatou ao médico que seguia todas as recomendações dietéticas e que nunca se esquecia das injeções de insulina. Embora a sua glicose sanguínea casual estivesse em 6 mmol/L (108 mg/dL), a concentração de HbA_{1c} era de 11% (com controle adequado: abaixo de 7%). Ele não apresentava glicosúria ou cetonúria.

Comentário. Os resultados da glicose sanguínea e urinária indicam um bom controle do diabetes deste garoto no tempo de aferição, mas o nível de HbA_{1c} sugere pouco controle ao longo das últimas três a seis semanas. A probabilidade é que ele somente tenha respeitado o tratamento dias antes de ter ido à clínica. Isso não é incomum em adolescentes, que acham difícil aceitar a necessidade de ajustar seus estilos de vida, algumas vezes exigente, ao tratamento do diabetes.

Finalmente, a acarbose é um inibidor de α-glicosidase intestinal, a qual digere açúcares complexos. Ela retarda a absorção intestinal de glicose.

Resumo

- A homeostase glicídica envolve interações entre os tecidos e órgãos-chave – fígado, tecido adiposo, músculo esquelético e pâncreas.

- O rompimento desse sistema homeostático resulta em condições potencialmente fatais – hipoglicemia e diabetes melito.

- O organismo alterna entre o jejum e o estado alimentado. As concentrações de metabólitos no sangue mudam durante o ciclo alimentação-jejum e são influenciadas pelo estresse e por doença.

- A dosagem da concentração plasmática de glicose é parte de uma avaliação de rotina de todo paciente admitido em um hospital. Em pacientes diabéticos, são realizados as dosagens de glicose, cetonas, HbA_{1c} e testes da função renal, incluindo microalbuminúria.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Descreva como a insulina causa um aumento na captação de glicose celular.

2. Quais são os hormônios anti-insulínicos?

3. Por que uma paciente não diabética trazida a uma unidade de emergência com queimaduras extensas teria um aumento da concentração plasmática de glicose?

4. Descreva o seu estado metabólico. Você deve pedir a um paciente para vir à clínica para dosar os triacilgliceróis plasmáticos. O paciente pergunta se precisa estar em jejum naquele dia. Dê uma resposta e explique as suas razões.

5. As pessoas com tolerância à glicose alterada desenvolvem complicações vasculares em longo prazo?

6. O que a obesidade e o diabetes melito têm em comum?

Leituras sugeridas

Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, et al. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J Intern Med*. 2007;262:184-198.

Bliss M. The Discovery of Insulin. Paul Haris Edinburgh Publishing, 1983;304.

Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2006;367:847-858.

Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993;329:977-986.

Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*. 2002;24:387-388.

Dominiczak MH. Obesity, glucose intolerance and diabetes and their links to cardiovascular disease. Implications for laboratory medicine. *CCLM*. 2003;41:1266-1278.

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26:S4-S20.

Jeffcoate SL. Diabetes control and complications: the role of glycated hemoglobin, 25 years on. *Diabetic Med*. 2004;21:6576-6665.

Sheen AJ. Exenatide once weekly in type 2 diabetes. *Lancet*. 2008;372:1197-1198.

Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 2007;445:881-885.

Stern MP. Diabetes and cardiovascular disease. The 'common soil' hypothesis. *Diabetes*. 1995;44:369-374.

Stumvoll M, Goldstein BJ, von Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005;365:1333-1346.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998;352:837-853.

Wong TY, Liew G, Tapp RJ, et al. Relation between fasting glucose and retinopathy for diagnosis of diabetes: three population-based cross-sectional studies. *Lancet*. 2008;371:736-743.

Zimmet P, Alberti KGMM, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001;414:782-787.

Zorzano A, Palacin M, Gumà A. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2005;183:44-48.

Nutrição e Balanço Energético

M.H. Dominiczak

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os mecanismos controladores da ingestão alimentar.
- Descrever o papel da quinase ativada por AMPK na manutenção do balanço energético celular.
- Identificar as principais categorias dos nutrientes e aqueles nutrientes que são essenciais dentro destas categorias.
- Relacionar seu conhecimento sobre o metabolismo energético com as recomendações nutricionais atuais.
- Caracterizar a desnutrição e a obesidade.
- Discutir a avaliação nutricional.

INTRODUÇÃO

Sob o ponto de vista bioquímico, a nutrição é uma interação essencial de um organismo com o ambiente. Nutrientes, a despeito de fornecerem energia para sobrevivência, sinalizam ao organismo de diversas maneiras, e isso por sua vez afeta seu uso e armazenamento. A nutrição sustenta a saúde e afeta a suscetibilidade à doença; tanto a desnutrição quanto a obesidade põem um organismo em risco.

O estado nutricional é determinado por fatores biológicos, psicológicos e sociais

Os fatores que determinam o estado nutricional de um indivíduo são seus antecedentes genéticos, o ambiente, a fase do ciclo de vida, o nível de atividade física e a presença de patologia (Fig. 22.1). O estado nutricional é influenciado pela disponibilidade de alimento, sua palatabilidade, variedade e a ausência ou presença de doença. As deficiências nutricionais podem ocorrer em função de dietas inadequadas ou por erros metabólicos geneticamente determinados.

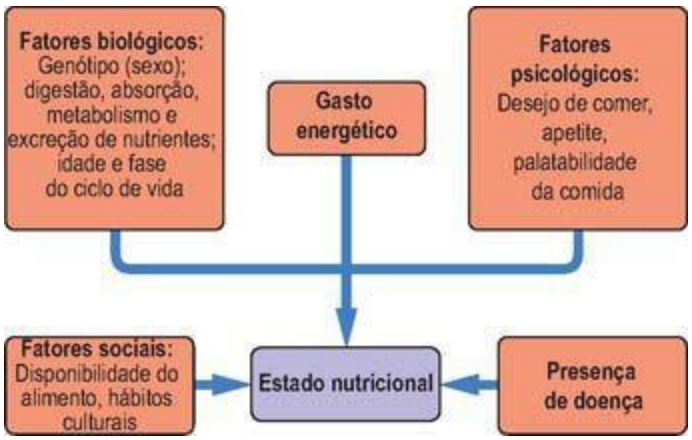


Fig. 22.1 Fatores que determinam o estado nutricional.

REGULAÇÃO DA INGESTÃO DE ALIMENTOS

A ingestão alimentar é controlada pela fome (um desejo de comer) e pelo apetite (um desejo de uma comida em particular).

Os principais centros reguladores do apetite estão localizados no hipotálamo, no sistema nervoso central (SNC). O apetite é regulado pelos núcleos hipotalâmicos arqueado e paraventricular.

O cérebro regula a homeostase energética e é também o regulador primário do peso corporal (Fig. 22.2). De acordo com o modelo lipostático da homeostase energética, os sinais que controlam a ingestão energética se originam no tecido adiposo e são enviados ao sistema nervoso central. Esses sinais são mediados pela adipocina leptina e pela insulina. Em resposta, o cérebro envia sinais eferentes por meio de uma complexa rede de neuropeptídios. Esses sinais regulam o apetite e a fome. Os neurônios no núcleo arqueado expressam dois neuropeptídeos: o catabólico pró-opiomelanocortina (POMC) e o anabólico neuropeptídeo Y/"proteína relacionada ao agouti" (NPY/AgRP). O POMC é clivado, gerando melanocortinas, como o α-MSH, que diminui a ingestão alimentar. O NPY/AgRP se liga a neurônios que expressam o "hormônio concentrador de melanocortina" (MCH) e as orexinas A e B. Estas, por sua vez, estão envolvidas no controle da ingestão alimentar pela sua atuação sobre os neurônios do tronco encefálico. Estes neurônios se conectam com o córtex cerebral (o centro de saciedade) para promover a fome e para estimular outro conjunto de hormônios, como tiroliberina (TRH), corticoliberina (CRH) e ocitocina. A tiroliberina aumenta a termogênese e a ingestão alimentar, enquanto a corticoliberina diminui a ingestão alimentar e, pela atividade simpática, aumenta o gasto energético. Sinais adicionais que controlam a ingestão alimentar são transmitidos por peptídeos gastrointestinais como o glucagon, colecistocinina, peptídio semelhante ao glucagon, amilina e peptídeo semelhante à bombesina. A grelina, liberada pelo estômago, estimula os neurônios que expressam NPY/AgRP. Este é o único peptídeo conhecido que estimula o apetite. O estiramento gástrico também afeta a ingestão alimentar. Finalmente, a hipoglicemia diminui a atividade do centro de saciedade.

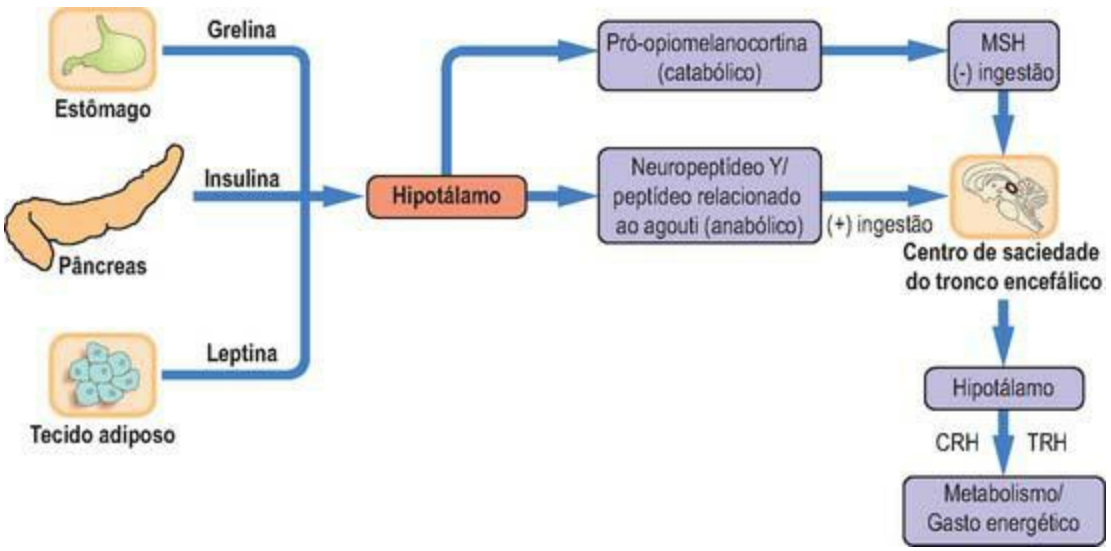


Fig. 22.2 Regulação da ingestão alimentar. A regulação da ingestão alimentar é estabelecida por sinais gerados no tecido adiposo, pâncreas, estômago e cérebro. O hipotálamo traduz sinais relacionados ao balanço energético em comportamento alimentar por meio da secreção de uma gama de neuropeptídeos. O sinal (+) indica ações que levam ao aumento do apetite e da ingestão alimentar e o sinal (-) indica uma diminuição. CRH, hormônio de liberação da corticotrofina; TRH, hormônio da liberação da tireotrofina; MSH, hormônio

estimulador de melanócitos.

Sistema canabinoide endógeno

O hipotálamo e o tronco encefálico traduzem a informação sobre o balanço energético em comportamento alimentar. Isso envolve o sistema canabinoide endógeno. Os endocanabinoides são compostos sintetizados de fosfolipídios de membrana. Estes incluem o Δ^9-tetra-hidrocanabinol e a anandamida, formados como um resultado da hidrólise da *N*-aracdonil-fosfatidil-etanolamina pela fosfolipase D. Os endocanabinoides são liberados nas sinapses e se ligam aos receptores sinápticos chamados CB1. Os receptores estão presentes no sistema nervoso central e também no intestino, tecido adiposo, fígado, músculo e pâncreas. Eles são acoplados a proteínas G, adenilato ciclase e também regulam canais de cálcio e potássio. A ligação dos endocanabinoides aos receptores modula a liberação de neurotransmissores como GABA, noradrenalina, glutamato e serotonina. Os níveis hipotalâmicos de endocanabinoides aumentam em períodos de privação alimentar. Um antagonista do receptor CB1, o rimonabant, agora é utilizado no tratamento da obesidade.

REGULAÇÃO DO BALANÇO ENERGÉTICO

O tecido adiposo é um órgão endócrino ativo

O tecido adiposo, longe de ser um depósito inerte de gordura, é um órgão endócrino ativo (Fig. 22.3). Seus produtos são conhecidos como adipocinas. Essa atividade endócrina influencia o desenvolvimento da obesidade e condições como a resistência à insulina e diabetes tipo 2. As duas principais adipocinas secretadas pelo tecido adiposo são a leptina e a adiponectina.

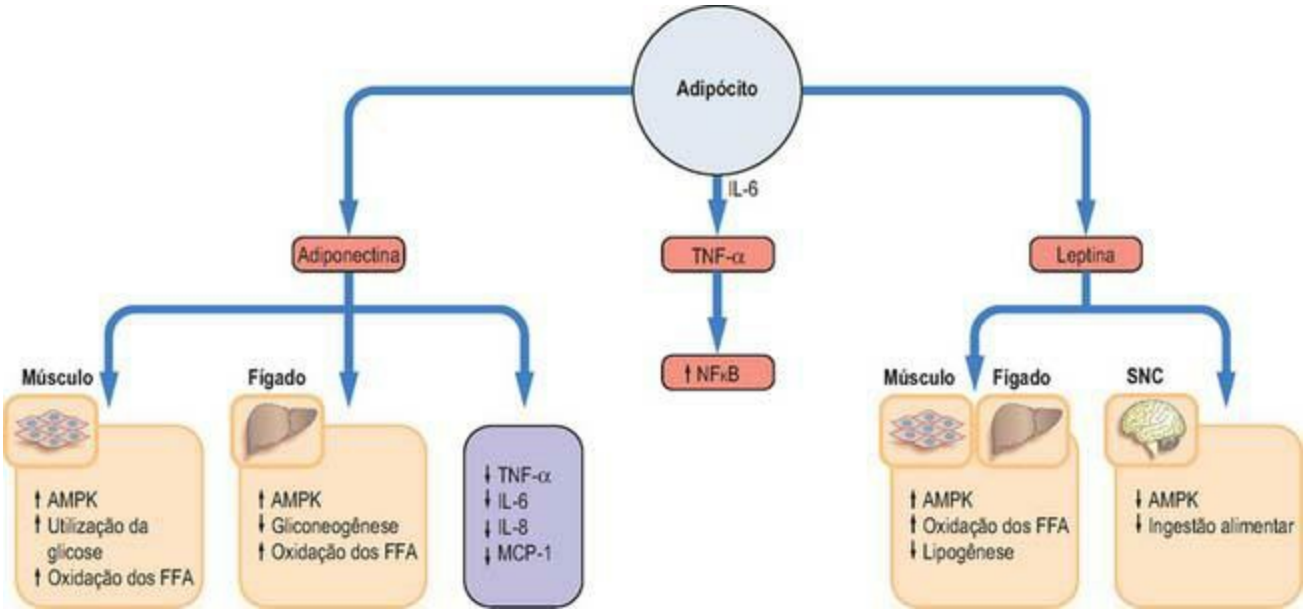


Fig. 22.3 Atividade endócrina do tecido adiposo. O tecido adiposo é um órgão endócrino e seus produtos são conhecidos como adipocinas. A leptina e a adiponectina têm um papel essencial no ajuste do metabolismo às necessidades energéticas corporais. Elas ativam a "enzima sensora de energia", a quinase ativada por AMP (AMPK). Os adipócitos também secretam uma gama de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α, IL-6, entre outras). O TNF- α é conhecido por estimular o fator de transcrição NFκB, um fator-chave na indução de genes envolvidos na resposta inflamatória. AMPK, quinase ativada por AMP; FFA, ácidos graxos livres; SNC, sistema nervoso central; IL, interleucina; TNF- α, fator de necrose tumoral α.

A leptina regula a massa do tecido adiposo e responde ao estado energético

A leptina é uma proteína de 16 kDa. Sua produção está ligada à massa de tecido adiposo e ao tamanho dos adipócitos. No sistema nervoso central, ela diminui a ingestão alimentar. Ela também atua no músculo esquelético, fígado, tecido adiposo e pâncreas. A expressão do gene da leptina é regulada pela ingestão alimentar, estado energético, hormônios e estado inflamatório. A leptina afeta o metabolismo ao estimular a oxidação dos ácidos graxos e diminuindo a lipogênese. É importante lembrar que ela também diminui a deposição ectópica de gordura no fígado e no músculo.

A leptina sinaliza por meio de receptores de membrana que apresentam um domínio de ligação extracelular e uma cauda intracelular. A sua via de sinalização involve a Janus quinase e o transdutor de sinal e ativador da trancrição (JAK/STAT; Cap. 40). A proteína quinase ativada por mitógeno e o fosfatidil inositol 3′ quinase também estão envolvidos. Seus sinais envolvem a quinase ativada por AMP (AMPK) (veja a seguir).

A adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina e sua carência leva à resistência à insulina

A adiponectina é uma proteína com 244 aminoácidos com uma homologia estrutural com os colágenos tipo VIII e X e com o fator C1q do complemento. Existem várias formas na circulação: globular, trimérica e de alto peso molecular. A adiponectina estimula a utilização de glicose pelo músculo e aumenta a oxidação de ácidos graxos no músculo e no fígado, desta forma aumentando a sensibilidade à insulina. Ela também diminui a produção de glicose hepática. Baixos níveis de adiponectina estão associados à resistência insulínica e à esteatose hepática. A adiponectina regula negativamente a secreção das citocinas pró-inflamatórias interleucina 6 e 8 (IL-6 e IL-8) e a proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1).

O exercício físico aumenta a expressão de adiponectina e regula positivamente seus receptores nos músculos esqueléticos. Por sua vez, sua concentração diminui na obesidade e na diabete tipo 2. Baixos níveis de adiponectina também estão associados a inflamação leve, estresse oxidativo e disfunção endotelial. Os receptores de adiponectina ativam a AMPK, a proteína quinase ativada por mitógeno p38 e PPAR α, a qual por sua vez regula o metabolismo dos ácidos graxos (Cap. 18).

O tecido adiposo secreta citocinas pró-inflamatórias

O tecido adiposo secreta as citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral α (TNF-α) e IL-6. O TNF-α é altamente expresso em animais e humanos obesos; além disso, também induz resistência à insulina e diabetes tipo 2. O TNF-α ativa a via pró-inflamatória do NFκ B (Cap. 38).

A quinase estimulada por AMP (AMPK) responde aos níveis de energia celulares

A AMPK é uma serina treonina quinase. Ela é um heterodímero codificado por três genes: ela tem uma subunidade catalítica a e duas subunidades regulatórias, β e γ. É ativada pela fosforilação por uma quinase conhecida como LKB1, que é uma molécula supressora de tumor. O ativador-chave da AMPK é o acúmulo celular de 5′-AMP e o aumento da razão 5′-AMP/ATP. Uma baixa razão de creatina/fosfocreatina também é capaz de ativar a enzima. Altas concentrações de 5′-AMP induzem modificações alostéricas e a fosforilação da subunidade catalítica da AMPK.

A AMPK estimula as vias de produção energética e suprime as vias de consumo energético

No músculo esquelético, a ativação da AMPK promove o transporte de glicose, a glicólise e a oxidação de ácidos graxos. Ela inibe a síntese de ácidos graxos pela fosforilação da acetil-CoA carboxilase. Isso leva a uma diminuição no malonil-CoA, à desinibição da carnitina palmintol transferase 1 e à consequente facilitação do transporte de ácidos graxos para a mitocôndria. O aumento da oxidação de ácidos graxos previne o acúmulo de lipídios nos tecidos. No fígado, a AMPK inibe a lipogênese e a síntese de colesterol; a sua ativação suprime o regulador da proteína de ligação ao elemento de resposta a esteroide 1c (SREBP1) (Cap. 18).

No músculo esquelético, a AMPK é ativada durante o exercício e está envolvida com o transporte de glicose estimulado pela contração muscular e a oxidação de ácidos graxos (sabe-se que o exercício aumenta a sensibilidade à insulina). No coração, ela é ativada pela isquemia.

A AMPK também age no nível hipotalâmico. A expressão da AMPK no hipotálamo reduz a ingestão alimentar. A leptnia e a adiponectina estimulam a AMPK no músculo esquelético, no fígado e no tecido adiposo. Ela é inibida no hipotálamo pela insulina e pela leptina. Drogas como as tiazolidinedionas e as biguanidas agem em parte por meio da AMPK (Cap. 21). Os efeitos da ativação da AMPK estão resumidos na Figura 22.4 (veja também o quadro da pág. 100).

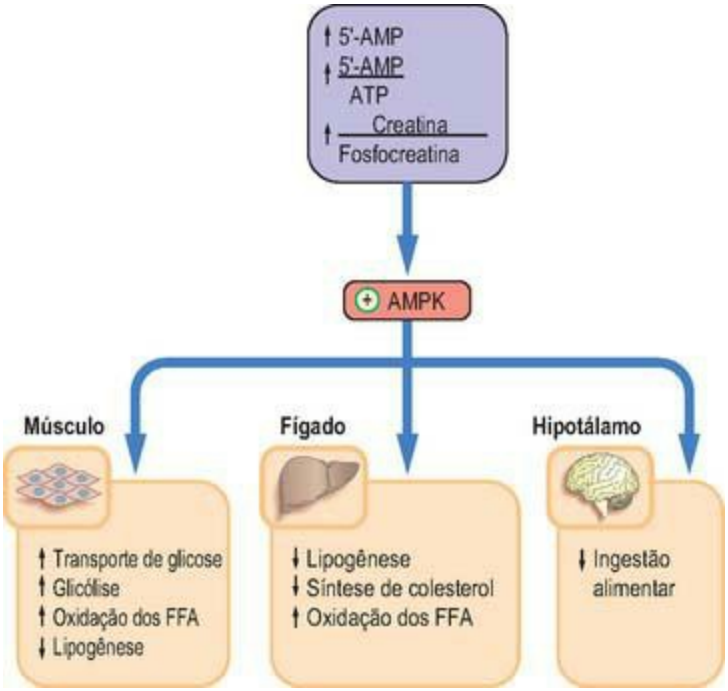


Fig. 22.4 Quinase ativada por AMP (AMPK). A AMPK realiza o papel de sensor celular dos níveis de energia. Seu maior estimulante é o aumento do 5′AMP, um produto da conversão do ATP. O aumento da proporção de 5′AMP para ATP sinaliza baixos níveis celulares de energia. A AMPK ativa fosforila enzimas limitantes nas vias de produção e utilização de energia. O efeito final é a inibição das vias de utilização energética, como as vias de lipogênese e a síntese de colesterol. Além disso, há o estímulo às vias que geram energia: glicólise e oxidação dos FFA. FFA, ácidos graxos livres.

Gasto energético

O gasto energético total diário é a soma da taxa metabólica basal, o efeito térmico do alimento e a energia consumida na atividade física.

O gasto energético pode ser medido pela calorimetria direta, que se vale de medições de produção de calor. A calorimetria indireta é baseada na medição da taxa de consumo de oxigênio (VO_2). A razão entre VCO_2 e VO_2 é conhecida como a taxa de troca respiratória (RER) ou quociente respiratório. Para os carboidratos, é RER=1; para lipídios, a RER=0,7.

O gasto energético necessário para manter a função corporal em repouso completo é chamado de taxa metabólica basal (BMR). A BMR varia de acordo com o sexo, idade e peso corporal. Em repouso, a energia é necessária para o transporte de membrana (30% do total), síntese e degradação proteica (30%), e para a manutenção de temperatura, atividade física e crescimento. Alguns órgãos utilizam particularmente grandes quantidades de energia: numa pessoa de 70 kg, o metabolismo cerebral constitui aproximadamente 20% da necessidade metabólica basal, o fígado 25% e os músculos 25%. Por sua vez, em bebês nascidos com peso muito baixo, o cérebro é responsável por tanto quanto 60% da BMR, o fígado por 20% e os músculos por apenas 5%.

Na saúde, a atividade física é o componente variável mais importante do gasto energético. Ela é normalmente expressa como múltiplos da BMR. Os exemplos de gasto energético associados às diferentes atividades são dados na Tabela 22.1. A necessidade energética também depende do sexo e da idade (Tabela 22.2).

Tabela 22.1 Gasto energético durante a atividade física. O gasto ener-gético é expresso como taxas de atividade física (múltiples da taxa metabólica basal, BMR) para os diferentes tipos de atividades. Dados do Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients for the United Kingdom; Report of the Panel on Dietary Reference Values of the Committee on Medical Aspects of Food Policy, London: TSO 2003.

Gasto energético durante a atividade física	
Taxa de atividade física	**Atividade**
1,0–1,4	Assistir televisão, ler, escrever
1,5–1,8	Lavar pratos, passar roupa
1,9–2,4	Tirar poeira e limpar, cozinhar
2,5–3,3	Vestir-se e despir-se, fazer a cama, andar devagar
3,4–4,4	Limpar janelas, jogar golf, carpintaria
4,5–5,9	Vôlei, caminhada rápida, dançar, correr devagar, cavar
6,0–7,9	Subir escadas, andar de biddeta, futebol, esquiar

Tabela 22.2 Necessidades energéticas diárias. Necessidades médias estimadas (EAR), de energia de acordo com o gênero e a faixa etária Dados do Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients for the United Kingdom; Report of the Panel on Dietary Reference Values of the Committee on Medical Aspects of Food Policy, London: TSO 2003.

Necessidades energéticas diárias

EAR kcal/dia (mJ)		
Idade	**Homens**	**Mulheres**
0-3 meses	545 (2,28)	515 (2,16)
4-6 meses	690 (2,89)	645 (2,69)
4-6 anos	1.715 (7,16)	2.545 (6,46)
15-18 anos	2.755 (11,51)	2.110 (8,83)
19-50 anos	2.550 (10,60)	1.940 (8,10)
75+ anos	2.100 (8,77)	1.810 (7,61)

DEFINIÇÕES NA CIÊNCIA NUTRICIONAL

A dieta é o total de todas as comidas e bebidas ingeridas por um indivíduo. O alimento ou comida é o alimento em particular que é ingerido e os nutrientes são componentes quimicamente definidos dos alimentos necessários ao corpo.

As recomendações de ingestão de nutrientes são baseadas em referências de ingestão dietéticas (DRI)

A ingestão alimentar não é trivial de ser avaliada. Os dados disponíveis são baseados em pesquisas populares (algumas vezes incompletas). Grupos de valores provenientes destas pesquisas descrevem a ingestão mínima, média e adequada sugerida de nutrientes em particular. Valores diferentes são usados em países diferentes e tem havido certa confusão e superposição entre as várias definições (veja o quadro). Atualmente, as estimativas de ingestão de nutrientes são baseadas nas referências de ingestão dietéticas (DRI), o conjunto de valores que descrevem a ingestão de um dado nutriente em uma população (Fig. 22.5). A DRI inclui:

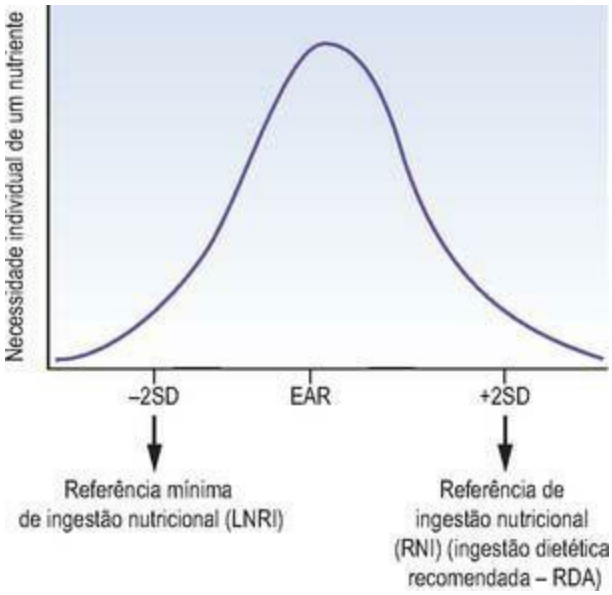


Fig. 22.5 Referência de ingestão dietética (RDA): os valores dos componentes. Enquanto a necessidade média estimada (EAR) reflete a ingestão adequada para metade da população, a RNI (ou RDA) representa a ingestão adequada para a grande maioria dos indivíduos. SD: desvio-padrão.

DEFINIÇÕES NA CIÊNCIA NUTRICIONAL

As definições a seguir são usadas pelo Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (IOM) das National Academies dos Estados Unidos.

Necessidade média estimada (EAR): média diária de ingestão de nutrientes estimada para alcançar as necessidades de metade dos indivíduos saudáveis de um grupo de um gênero em particular, em uma determinada faixa etária. A EAR é complementada por outros dois valores:

(1) Ingestão dietética recomendada (RDA; no Reino Unido: referência de iingestão nutricional, RNI). Descreve a média de ingestão nutricional suficiente para atender as necessidades nutricionais de aproximadamente (97%-98%) todos os indivíduos saudáveis.

(2) Referência mínima de ingestão nutricional (LNRI), usada no Reino Unido: a ingestão mínima diária observada numa população em particular (aproximadamente 2%), sem que ocorra deficiência. Se a ingestão cair abaixo deste nível, pode ocorrer uma deficiência.

Ingestão adequada (AI): média da ingestão nutricional diária recomendada baseada em estimativas de ingestão nutricional por um grupo de indivíduos saudáveis que é assumido como adequado – usado quando uma RDA não pode ser determinada.

Ingestão máxima tolerável (UL): média da ingestão máxima diária mais provável a não causar dano à saúde para quase todos os indivíduos de um gênero em particular, numa determinada faixa etária. Se a ingestão aumentar além da UL, o risco de efeitos adversos aumenta.

Note que as referências de ingestão dietéticas substituíram os valores dietéticos de referência (DRVs), usados previamente no Reino Unido, e a ingestão dietética recomendada (RDAs), usada nos Estados Unidos. Veja mais detalhes em Leituras sugeridas.

- necessidade média estimada (EAR)
- ingestão dietética recomendada (RDA)
- ingestão adequada (AI)
- ingestão máxima tolerável (UL)

Os valores de EAR e de RDA são dados para um dado nutriente ou, se este não puder ser determinado, a AI é usada. Veja o quadro para definições relevantes. Considere que as DRI são propostas para pessoas saudáveis. Da mesma forma, uma DRI estabelecida para qualquer nutriente pressupõe que as necessidades de outros estão sendo estabelecidas.

NUTRIGENÔMICA

A resposta individual variável aos nutrientes é substancialmente determinada pela genética. Os genes influenciam a digestão e a absorção de nutrientes, seu metabolismo e excreção. As percepções de atributos como sabor e saciedade também são, em determinada extensão, determinadas geneticamente. Isso tem consequências para os guias nutricionais: porque o "*pool*" de genes varia entre populações, os guias nutricionais ótimos devem ser específicos da população, ao invés de gerais. A nutrigenômica tem uma enorme quantidade de aplicações potenciais para intervenções nutricionais futuras. Ela é análoga à farmacogenômica: tem como objetivo explorar o conhecimento acumulado pelo projeto genoma humano e a habilidade de monitorar a expressão de um grande número de genes, para criar tratamentos individuais dietéticos personalizados para um determinado *background* genético. A metabolômica, ou seja, o monitoramento da resposta metabólica aos nutrientes, oferece oportunidades adicionais para determinar os perfis nutricionais individuais (Cap. 36).

O genótipo influencia as concentrações plasmáticas dos nutrientes

Um exemplo do efeito do genótipo na ingestão de nutrientes é a resposta da concentração do colesterol plasmático ao seu conteúdo dietético. Cerca de 50% da variação individual no colesterol plasmático é geneticamente determinada. A resposta a uma dieta contendo colesterol é associada ao genótipo da apoproteína E (apoE). A apoE é uma proteína sintetizada pelo fígado e é o principal condutor metabólico das partículas remanescentes (Cap. 18). Existem várias isoformas da apoE, codificadas pelos alelos designados por e2, e3 e e4. Foi demonstrado que a concentração plasmática de colesterol aumenta em dietas com pouca gordura/alto em colesterol em pessoas com o fenótipo E4/4, mas não nas pessoas com o fenótipo E2/2.

Existem vários exemplos de nutrientes que afetam a expressão gênica. Por exemplo, as atividades de enzimas hepáticas-chave diferem em pessoas que seguem uma dieta rica em gordura de longo prazo, comparada com dietas ricas em carboidratos. A quantidade de colesterol dietético afeta a atividade da HMG-CoA redutase. Os ácidos graxos poli-insaturados inibem a expressão de ácidos graxos sintase e osω-3 ácidos graxos (veja a seguir) reduzem a síntese de RNA para o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), bem como a citocina inflamatória interleucina 1 (IL-1). Na hipertensão essencial, a sensibilidade ao sal dietético é controlada, pelo menos em algum nível, pelos variantes do gene do angiotensinogêneo. Apenas 50% dos pacientes são sensíveis à ingestão de sal: 30%-60% da variação de pressão arterial é relacionada ao genótipo. Os fatores genéticos também são fundamentais na obesidade: mais de 50% da variação de peso corporal está associada ao *background* genético. A obesidade é recíproca em 74% dos gêmeos homozigóticos e em 32% dos gêmeos dizigóticos.

Nutrição, ciclo vital e adaptação metabólica

A necessidade de nutrientes é afetada tanto por fatores fisiológicos quanto por doenças. Gravidez, lactação e crescimento (em particular o intenso crescimento no útero, durante a infância e o estirão de crescimento da adolescência) são os três estados fisiológicos mais importantes associados ao aumento da demanda de nutrientes.

A gravidez é um exemplo de adaptação metabólica chamado de adaptação expansiva. Neste caso, o corpo da mãe se adapta para carregar o feto e fornecer-lhe os nutrientes. Próximo ao momento da concepção, o corpo da mãe se prepara para as necessidades metabólicas do feto. No início da gravidez, a mãe prepara a "capacidade de fornecimento" e posteriormente, na gravidez, esse fornecimento ocorre; 90% do peso fetal é obtido entre a 20ª e a 40ª semana de gravidez e ganho mais expressivo é estabelecido entre a 24ª e a 36ª semanas. A quantidade total de energia armazenada durante a gravidez é de cerca de 70.000 kcal (293.090 kJ), um total de aproximadamente 10 kg de peso.

A ingestão de alimento muda ao longo do ciclo de vida. Depois do parto, há uma transição entre alimentar-se pela placenta para a amamentação e então, gradualmente, o bebê se adapta à dieta livre. Até o estágio de amamentação, a nutrição é controlada por substratos e a criança é completamente dependente da mãe para sua nutrição. Posteriormente, o hormônio do crescimento assume o papel principal no direcionamento do desenvolvimento. Na idade escolar, novos padrões de alimentação e atividade surgem à medida que a criança aprende a ser independente dos pais. Isso continua durante a adolescência. Neste estágio, os hormônios sexuais começam a ter um papel relevante no desenvolvimento. Na vida adulta, a massa muscular aumenta entre os 20 e 30 anos de idade, e nesse ponto o nível de atividade física se estabiliza. Após isso, a massa muscular começa a declinar e a massa adiposa a aumentar. Isso se acelera depois dos 60 anos. A massa óssea também diminui com a idade.

Quando os nutrientes têm um fornecimento reduzido, tanto pela necessidade nutricional aumentada ou pela menor disponibilidade do alimento, a chamada adaptação redutiva ocorre: a taxa metabólica diminui, bem como o desejo de comer. Tais medidas limitam a perda de peso.

PRINCIPAIS CLASSES DE NUTRIENTES

Os principais nutrientes são os carboidratos (incluindo as fibras), gorduras, proteínas, minerais e vitaminas. Os carboidratos, proteínas, gorduras, fibras e alguns minerais são macronutrientes. As vitaminas e metais traço são micronutrientes (Cap. 11). O valor calórico dos principais nutrientes é fornecido na Tabela 22.3. A função dos nutrientes está resumida na Figura 22.6.

Tabela 22.3 **Conteúdo calórico dos nutrientes** (1 kJ = 239 cal; 1 kcal = 4.184 kJ).

Conteúdo calórico dos nutrientes		
	Energia	
Nutriente	**kJ**	**kcal/g**
Amido	17	4
Glicose	17	4
Gordura	37	9
Proteína	17	4

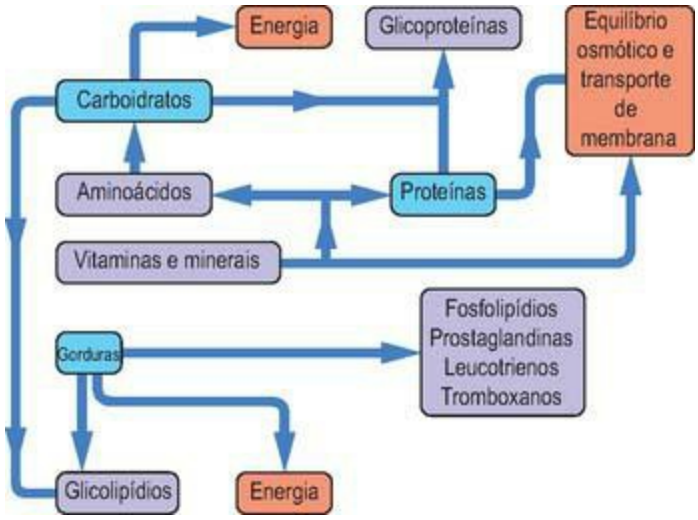


Fig. 22.6 A função dos nutrientes. Todas as principais classes de nutrientes podem ser usadas para a produção de energia, e todas contribuem para síntese de compostos mais complexos. O papel principal das vitaminas e minerais é a participação em reações enzimáticas. Para as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, Cap. 40; Glicoproteínas, Cap. 26; Glicolipídios, Cap. 27.

Carboidratos

Os carboidratos e as gorduras são as fontes energéticas mais importantes. Eles também são precursores das glicoproteínas, glicolipídios e mucopolissacarídeos. Os carboidratos da dieta incluem carboidratos refinados como a sacarose nos doces, bebidas e sucos de fruta, e carboidratos complexos como o amido, presente nos grãos e na batata. As fibras são carboidratos indigeríveis para o intestino humano, como a celulose, a hemicelulose, a lignina, a pectina e o β -glucano. As fibras estão presentes em cereais não processados, legumes, vegetais e frutas. Seu principal papel é regular a motilidade e o trânsito intestinal.

Proteínas

As proteínas dietéticas são digeridas aos seus componentes aminoácidos. Os aminoácidos da dieta são usados como material para construir as próprias proteínas do organismo. Elas também servem como última fonte de substrato energético (Cap. 19). Em função da diferente composição das proteínas animais e vegetais, não se alimentar de produtos animais de qualquer fonte pode levar a deficiências nutricionais como aquelas de vitamina B_{12}, cálcio, ferro e zinco. Da mesma forma que as necessidades energéticas, as necessidades proteicas mudam ao longo da vida (Tabela 22.4). O aumento da necessidade de proteínas se associa à gravidez, à lactação e ao estirão de crescimento da adolescência.

Tabela 22.4 Necessidades diárias de proteínas. As necessidades pro-teicas são dependentes de gênero e idade. Aqui são mostradas as refe-rências de ingestão nutricional (RNI), de acordo com a faixa etária e sexo. Dados do Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients for the United Kingdom; Boletim do Panel on Dietary Reference Values of the Committee on Medical Aspects of Food Policy, London: TSO 2003

Necessidade diária de proteínas		
Idade	**g/dia homens**	**g/dia mulheres**
0-3 meses	12,5	12,5

10-12 meses	14,9	14,9
4-6 anos	19,7	19,7
15-18 anos	55,2	45
19-50 anos	55,5	45
50+ anos	53,3	46,5

Gorduras

As gorduras são os nutrientes mais importantes para o armazenamento energético. Os lipídios também fornecem isolamento térmico para o organismo. Eles são componentes essenciais das membranas biológicas e servem como substrato para a síntese de glicolipídios, glicoproteínas e também fosfolipídios, prostaglandinas, leucotrienos e tromboxano. Eles são particularmente importantes para o desenvolvimento do cérebro e da retina (Tabela 3.2).

Ácidos graxos são moléculas sinalizadoras

As moléculas derivadas de lipídios têm muitas funções de sinalização e são ligantes ativadores de fatores de transcrição. Os ácidos graxos, por exemplo, estimulam o acúmulo de diacil-glicerol (DAG), ativam a isoforma δ da proteína quinase C (PKC) hepática, e diminuem a fosforilação de tirosina das proteínas substrato do receptor de insulina 1 e 2 (IRS1 e 2). A PKC, por sua vez, ativa a NADPH oxidase e aumenta a geração de espécies reativas do oxigênio, aumentando o estresse oxidativo. Os ácidos graxos livres (FFA) também estimulam a via do NFκ B.

As gorduras são classificadas como saturadas e insaturadas (e dentro da última categoria há ainda uma subdivisão em mono e poli-insaturadas).

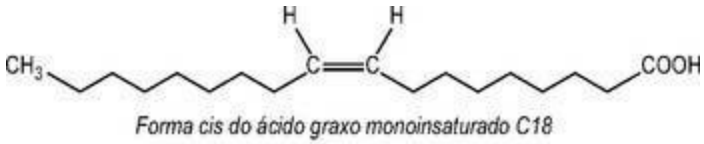
Gorduras saturadas

Ácidos graxos de cadeia longa não são solúveis em água, mas os ácidos graxos de cadeia curta (C4-6) e média (C8-10) são. Ácidos graxos de cadeias curta e média são transportados no plasma, em vez de nos quilomícrons. O ácido graxo saturado mais comum é o ácido palmítico (C16). Outros são o esteárico (C18), mirístico (C14) e láurico (C12). Todas as gorduras animais (gordura da carne, manteiga e banha) são altamente saturadas. As gorduras saturadas estão presentes também nos óleos de dendê, manteiga de cacau e óleo de coco.

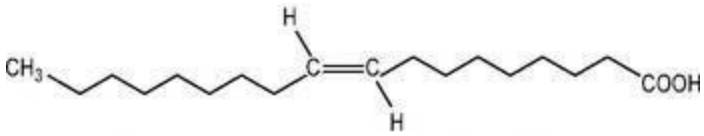
Gorduras monoinsaturadas

O ácido oleico (ω-9) é o único ácido graxo monoinsaturado dietético importante

Os ácidos graxos monoinsaturados estão presentes em todas as gorduras animais e vegetais. O azeite de oliva é uma fonte particularmente rica de gorduras monoinsaturadas. As gorduras monoinsaturadas *trans* (Fig. 22.7), os isômeros *cis* do ácido oleico, são subprodutos do processo de hidrogenação dos óleos vegetais líquidos. Os ácidos graxos *trans* provenientes da hidrogenação de gorduras estão associados ao aumento de risco de doença coronariana.



Forma cis do ácido graxo monoinsaturado C18



Forma trans do ácido graxo monoinsaturado C18

Fig. 22.7 O exemplo dos ácidos graxos monoinsaturados *cis*e *trans* (ácido oleico, 18 carbonos). Os ácidos graxos *trans* são produzidos durante a hidrogenação dos óleos vegetais líquidos.

Gorduras poli-insaturadas

Os ácidos graxos poli-insaturados incluem os ácidos ω-6 e ω-3

Os ácidos ω -6 são o ácido araquidônico (ω-6, C-20:4, $\Delta^{5,8,11,14}$) e seu precursor, o ácido linoleico (ω-6, C-18:2, $\Delta^{9,12}$). Eles estão presentes em óleos vegetais. Os ácidos graxos ω-6 estão presentes nos óleos de soja e de canola e nos óleos de peixe (particularmente em peixes gordurosos como salmão e sardinhas).

Os ácidos graxos ω-3 são os ácidosα -linolênico (ω-3, C-18:3,$\Delta^{9,12,15}$), eicosapentanoico (ω-3, C-20:5,$\Delta^{5,8,11,14,17}$) e docosa-hexanoico (ω-3, C-22:6,$\Delta^{4,7,10,13,16,19}$). Eles estão presentes sobretudo em peixes, mariscos, fitoplâncton e também em alguns vegetais como azeitona (oliva), açafrão, milho, girassol, soja e vegetais folhosos.

NUTRIENTES ESSENCIAIS (LIMITANTES)

Nutrientes essenciais não podem ser sintetizados pelo corpo humano e desta forma precisam ser fornecidos externamente. Eles incluem os aminoácidos essenciais, os ácidos graxos essenciais (EFA) e algumas vitaminas e metais traço. Os carboidratos (glicose e amidos) não são nutrientes essenciais.

Aminoácidos essenciais

Os aminoácidos essenciais são a fenilalanina (a tirosina pode ser sintetizada da fenilalanina), e os aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina, isoleucina, treonina, metionina e lisina. Algumas proteínas vegetais são relativamente deficientes em aminoácidos essenciais, enquanto as proteínas animais normalmente contêm uma mistura balanceada (Cap. 19).

Lipídios essenciais

Os ácidos graxos essenciais (EFA) são os ácidos linoleico e α-linolênico. Os ácidos araquidônico, eicosapentanoico e o docosa-hexanoico podem ser feitos, em quantidades limitadas, dos EFA: no entanto, eles se tornam nutrientes essenciais quando os EFA estão deficientes.

MINERAIS

Os principais minerais são o sódio, o potássio, o cloro, o cálcio, o fosfato e o magnésio

O sódio é importante para a manutenção do volume extracelular (Cap. 23). Ele participa na atividade eletrofisiológica e, em conjunto com o potássio, é essencial na manutenção do potencial transmembrana (Cap. 8). O potássio é o principal cátion intracelular. É importante frisar que a hipercalemia e a hipocalemia levam a arritmias e podem ser potencialmente perigosas. O potássio está presente em vegetais e frutas, particularmente em bananas e sucos de fruta. A ingestão dietética de potássio precisa ser limitada em doentes renais por conta de sua excreção prejudicada e tendência à hipercalemia (Cap. 23).

O balanço do cálcio e do fosfato é importante para a manutenção da estrutura óssea (Cap. 25). O cálcio pode ser encontrado no leite, nos laticínios e em alguns vegetais. Os fosfatos podem ser encontrados nas células animais e vegetais.

O magnésio é importante para o desenvolvimento do esqueleto e para a manutenção do potencial elétrico nas membranas neuronais e musculares. Ele também é um cofator para enzimas que requerem ATP, é importante para a replicação de DNA e para a síntese de RNA. A deficiência de magnésio se manifesta no jejum prolongado e na má absorção, pode ocorrer devido à perda gastrointestinal em função de diarreia e vômito e algumas vezes em função de tratamento diurético ou procedimentos cirúrgicos no trato gastrointestinal. A deficiência também está associada à pancreatite aguda e alcoolismo. A hipomagnesemia é usualmente acompanhada de hipocalcemia. A deficiência de magnésio leva à fraqueza muscular e à arritmia cardíaca.

Ferro

O ferro é importante na transferência do oxigênio molecular e é um componente do heme na hemoglobina e na mioglobina (Cap. 5). Os citocromos a, b e c também contêm ferro (Cap. 9). De maneira geral, há 3-4 g de ferro no corpo. Setenta e cinco por cento do ferro do corpo está na hemoglobina e na mioglobina, e 25% são armazenados em tecidos como medula óssea, fígado e no sistema retículo endotelial.

O ferro é absorvido na parte superior do intestino delgado. A carne e o ácido ascórbico aumentam sua absorção, enquanto as fibras vegetais a inibem. O ferro é transportado no sangue ligado à transferrina e armazenado como ferritina e hemossiderina. A transferrina é normalmente saturada de ferro em aproximadamente 30%. O ferro é perdido pela pele e pelo trato gastrointestinal. Os humanos não têm um mecanismo para excretar ferro, que em sua forma livre é tóxico.

O ferro dietético se encontra em sua forma Fe^{+3}. Ele é reduzido no trato gastrointestinal ao Fe^{+2} pelo ascorbato e pela enzima redutase férrica localizada na "borda em escova" intestinal. O Fe^{+2} é transportado para dentro das células por um transportador de metais divalentes (o qual transporta a maioria dos metais traço). O total de ferro no enterócito é controlado por proteínas reguladoras de ferro. O conteúdo de ferro do eritrócito afeta a absorção de ferro pelo intestino. Se os eritrócitos estiverem ricos em ferro, este será armazenado no enterócito incorporado à ferritina. Caso contrário, ele será transportado pela membrana basolateral, onde uma das proteínas facilitadoras do transporte (ferroxidase, também conhecida como hefaestina) oxida o Fe^{+2} em Fe^{+3}, o qual se ligará então à transferrina plasmática. A transferrina é retirada de medula óssea por células precursoras de eritrócitos, num processo dependente do receptor. Dentro das células, o ferro é liberado, reduzido a Fe^{+2} e transportado até a mitocôndria para a sua incorporação na molécula de heme. Após a destruição dos eritrócitos velhos pelos macrófagos do sistema retículo endotelial, o ferro é liberado como Fe^{+2}, oxidado a Fe^{+3} novamente e ligado mais uma vez à transferrina. O esquema do metabolismo do ferro é mostrado na Figura 22.8.

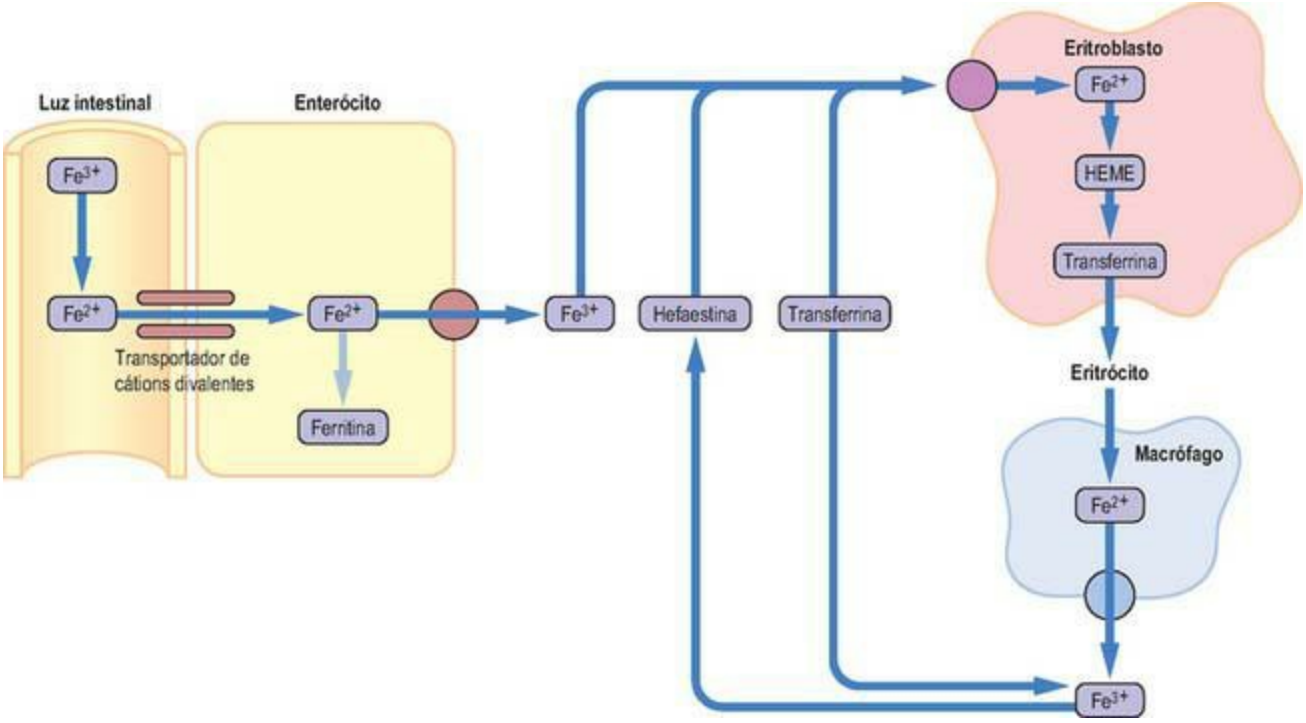


Fig. 22.8 O metabolismo do ferro. O ferro dietético é absorvido do intestino e será tanto armazenado nos enterócitos como ferritina como transportado para o plasma. No plasma, o ferro se mantém ligado à transferrina. Ele é captado por outras células, como os eritroblastos, por meio do receptor de membrana para a transferrina. Nos eritroblastos, o ferro é incorporado ao heme e então à hemoglobina. Os eritrócitos velhos são degradados pelos macrófagos do sistema retículo endotelial. O ferro é liberado das células e reciclado ligado à transferrina. Note que o ferro dietético está na forma férrica (Fe^{+3}). Ele é reduzido à forma ferrosa (Fe^{+2}) na borda em escova intestinal. A forma transportada do ferro é a férrica, mas a forma incorporada ao heme é a ferrosa (Fig. 34.8).

A necessidade de ferro aumenta durante o crescimento e a gravidez. A deficiência de ferro ocasiona eritropoiese defeituosa e anemia hipocrômica normocítica ou microcítica (pequenos eritrócitos). Estes problemas ocorrem mais em crianças e adolescentes, grávidas, em mulheres menstruando e também nos idosos. A deficiência de ferro usualmente se desenvolve como um resultado de perda sanguínea anormal, e desta forma pessoas que apresentam anemia ferropriva devem sempre investigar as causas de sangramentos, em particular no trato gastrointestinal.

HEMOCROMATOSE

A hemocromatose é um distúrbio autossômico recessivo que ocorre em função do aumento da absorção do ferro. É o distúrbio herdado mais comum entre as pessoas com ancestrais do Norte europeu. O ferro acumula no coração, fígado, pâncreas e pode causar cirrose hepática, carcinoma hepatocelular, diabetes, artrite e insuficiência cardíaca. Na forma clássica da hemocromatose, os genes mutados codificam uma proteína conhecida como proteína da hemocromatose hereditária (HFE), a qual é estruturalmente similar aos principais antígenos de histocompatibilidade do tipo I (Cap. 38). Atualmente sabemos que mutações de outras proteínas podem levar a manifestações clínicas muito semelhantes à hemocromatose.

Fontes dietéticas de ferro incluem vísceras animais, aves, peixes, ostras, além de gemas de ovos, grãos secos, figos e tâmaras secas, e alguns vegetais verdes. A avaliação dos níveis de ferro inclui a medida da transferrina e da ferritina no plasma, variáveis hematológicas e a citologia da medula óssea.

Metais traço e vitaminas

As vitaminas e os metais traço são importantes para a catálise de diversas reações químicas. Eles atuam como coenzimas e formam grupos prostéticos enzimáticos funcionalmente importantes. Eles são discutidos em detalhe no capítulo 11.

AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

A avaliação nutricional inclui a avaliação clínica do estado nutricional, a avaliação dos hábitos dietéticos, histórico dietético, medidas antropométricas, testes bioquímicos e hematológicos. Uma vez que não há um marcador definitivo e único do estado nutricional, a avaliação se baseia na interpretação de uma gama de variáveis.

Peso corporal e o índice de massa corporal

O peso corporal em relação à altura é a medida mais usada na avaliação nutricional. A relação entre ambos é expressa como índice de massa corporal (IMC), calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$IMC = \text{peso (kg)}/\text{altura(cm)}^2$$

O ABC DO TRATAMENTO DE EMERGÊNCIA

Comer e beber, assim como respirar, conectam os organismos vivos com o ambiente. Para sobreviver, precisamos de oxigênio, água e nutrientes. Uma pessoa pode sobreviver, sem oxigênio apenas por alguns minutos. Sem água, o tempo de sobrevivência é de dias. Com estes dois supridos, uma pessoa pode viver sem comer por um período de 60 a 90 dias.

Essas considerações determinam a urgência do tratamento quando as coisas vão mal. Restabelecer o suprimento de oxigênio e o volume circulante é a primeira prioridade (ABC da ressuscitação: vias aéreas, respiração e circulação). A reposição dos fluidos e eletrólitos perdidos também é necessária dentro de horas a dias, dependendo do estado do paciente. O fornecimento de outros nutrientes se torna importante assim que as medidas de salvamento tenham sido tomadas. De maneira geral, os pacientes impossibilitados de comer precisarão de suporte nutricional, se ficaram (ou ficarem) impossibilitados de comer por 5-7 dias. O período é menor para pessoas hipercatabólicas.

O IMC é usado para categorizar o estado nutricional, como mostrado na Tabela 22.5. Como mencionado anteriormente, o IMC isolado não deve ser utilizado como indicador único/definitivo do estado nutricional.

Tabela 22.5 Índice de massa corporal e estado nutricional.

Índice de massa corporal (IMC) e estado nutricional	
IMC	**Interpretação**
<18,5	desnutrido
18,5-20	abaixo do peso
21-25	desejável
26-30	sobrepeso
>30	obeso

Outras medidas utilizadas na avaliação nutricional são a relação cintura-quadril, a circunferência do antebraço e a espessura da pele, medida por um paquímetro devidamente calibrado. A simples medida da circunferência da cintura é correlacionada com a quantidade de gordura visceral e é usada no diagnóstico da síndrome metabólica (Cap. 21). Análises mais detalhadas incluem a avaliação da água corporal total, análise da impedância bioelétrica corporal e a medida da massa magra corporal utilizando a absorciometria de raios X de dupla energia (DEXA). Algumas destas medidas permitem o cálculo de variáveis como o conteúdo de gordura corporal e a composição corporal. Medidas funcionais como força de preensão ou pico de fluxo expiratório também são relevantes para a avaliação nutricional. A avaliação completa envolve a medida das vitaminas e dos metais traço. Isso é particularmente importante em pacientes que permanecem por muito tempo com nutrição parenteral.

A excreção urinária de nitrogênio ajuda a avaliar o balanço de nitrogênio

O balanço do nitrogênio se relaciona com as necessidades corporais de proteína. É a diferença entre a ingestão de nitrogênio e sua excreção. O balanço nitrogenado positivo significa que a ingestão excedeu a excreção, enquanto o balanço nitrogenado negativo significa que a excreção excedeu a ingestão. A excreção urinária de nitrogênio é uma estimativa da quantidade de proteínas metabolizadas pelo corpo em 24 horas. Noventa por cento do nitrogênio excretado aparece na urina (80% destes como ureia). O resto é excretado com as fezes, cabelo e suor. A excreção de nitrogênio se ajusta à ingestão proteica dentro de dois a quatro dias. As medidas da excreção do nitrogênio urinário (ou ureia) são a maneira mais confiável de avaliar as necessidades proteicas diárias. Atualmente, é raramente utilizada fora do ambiente de pesquisa. Como um guia, a maior parte das pessoas necessita de 1-1,2 g proteína/kg de peso corporal/dia. As exigências proteicas de acordo com as faixas etárias estão listadas na Tabela 22.4 (Cap. 19).



UMA MULHER COM INSUFICIÊNCIA RENAL E PERDA DE PESO

Uma mulher com 59 anos de idade foi admitida na unidade renal com infecções e endocardite recorrentes. Ela foi tratada com hemodiálise por cinco anos e durante um período de dois anos ela perdeu 33% de seu peso corporal. Ela apresentava muito pouco apetite e consumia duas porções de *milkshake* que substituem uma refeição (1,5 kcal/mL) ao dia. Ela se apresentava anúrica e sua ingestão de líquidos era restrita a 1.000 mL diariamente. Sua altura era de 1,68 m e ela pesava 52,7 kg; o IMC era de 18. Seus resultados bioquímicos mais recentes revelavam hipercalemia entre 5,7 e 6,2 mmol/L.

Comentário. Por conta de seu pobre estado nutricional e perda de peso contínua, ela deve continuar a ingerir suplementos nutricionais para minimizar perdas de peso adicionais. No entanto, por causa da hipercalemia, uma porção alimentar pobre em eletrólitos deve ser considerada. Ela estava ingerindo inicialmente 22 mmol de potássio, no *milkshake* de 1,5 kcal/mL. Subsequentemente, este foi trocado para uma porção pobre em eletrólitos, a qual forneceu 12 mmol no total. Os padrões do Renal Nutrition Group Standards do Reino Unido recomendam que a ingestão de potássio em pacientes deste tipo seja menor que 1 mmol/kg de peso corporal. Suplementos auxiliares no emagrecimento pobres em eletrólitos/volume devem sempre ser considerados para pacientes renais e os eletrólitos séricos devem sempre ser rigorosamente monitorados (Cap. 23).

Diferentes proteínas plasmáticas têm sido usadas como marcadores do estado nutricional

A concentração de uma proteína no plasma pode refletir o estado nutricional durante o período de tempo relacionado a sua meia-vida. As proteínas normalmente utilizadas com este fim são a albumina e a transtirretina (pré-albumina). Diversos estudos confirmam a ligação entre a síntese de albumina no fígado (a meia-vida da albumina é de aproximadamente 20 dias; Cap. 4) e o estado nutricional. A transtirretina, a qual tem uma meia-vida de dois dias, também tem sido utilizada na avaliação nutricional. Ela é sintetizada no fígado e forma um complexo com a proteína de ligação ao retinal no plasma. Infelizmente, a interpretação das concentrações plasmáticas das proteínas

nutricionalmente relevantes é usualmente difícil, porque elas não são exclusivamente determinadas pelo estado nutricional. Por exemplo, a concentração plasmática de albumina também depende do estado de hidratação: ela diminui em pacientes hiper-hidratados. Além disso, a albumina e a transtirretina são afetadas pela resposta de fase aguda (a concentração de transtirretina aumenta durante a reação de fase aguda, enquanto a concentração de albumina diminui). Tudo isso significa que elas não podem ser interpretadas isoladamente, mas são úteis quando vistas como parte de um quadro clínico global.

Testes laboratoriais gerais fornecem informações suplementares à avaliação nutricional

A medida da hemoglobina pode revelar uma deficiência de ferro. A avaliação da função hepática (Cap. 29) e renal (Cap. 23), as medidas séricas de sódio, potássio, cloro, bicarbonato, cálcio, fosfato e magnésio, além da avaliação do metabolismo de ferro, fornecem informações adicionais úteis. A avaliação diária da ingestão e perda de líquido é essencial em pacientes que são considerados para o suporte nutricional.

DESNUTRIÇÃO

A desnutrição é um declínio gradual no estado nutricional, que, em estados mais avançados, leva a um decréscimo na capacidade funcional e outras complicações. A desnutrição energética proteica (PEM, do inglês "*protein energy malnutrition*") é definida como um estado nutricional pobre devido à ingestão inadequada de nutrientes.

A ingestão reduzida de nutrientes leva a uma adaptação redutiva que inclui um decréscimo nos estoques de nutrientes, mudanças na composição corporal e um uso mais eficiente de combustíveis tais como o uso de corpos cetônicos pelo cérebro (as mudanças metabólicas que acompanham o jejum estão descritas no capítulo 21).

A desnutrição é uma das questões-chave encaradas pelo serviço de saúde pública dos países em desenvolvimento e precisa ser vista não apenas sob a perspectiva médica, mas também social e econômica. A mortalidade em pacientes subnutridos (IMC entre 10 e 13) é quatro vezes maior quando comparada com pessoas bem-nutridas. Os efeitos da desnutrição são resumidos na Tabela 22.6. Em todo o mundo, a desnutrição contribui com 54% dos 11,6 milhões de mortes anuais entre crianças abaixo dos cinco anos de idade.

Tabela 22.6 Consequências da desnutrição calórico-proteica.

Consequências da desnutrição calórico-proteica
Síntese de proteínas reduzida
Atividade da Na^+/K^+-ATPase reduzida
Transporte de glicose reduzido
Esteatose hepática, necrose hepática, fibrose hepática
Depressão, apatia, alterações de humor

Hipotermia
Ventilação comprometida
Sistema imune comprometido; cicatrização prejudicada
Risco de não cicatrização
Débito cardíaco reduzido
Função renal reduzida
Perda deforça muscular
Anorexia
Mobilidade reduzida

Nos países desenvolvidos, a desnutrição é um problema dos pacientes hospitalizados que são incapazes de se alimentar por conta de suas patologias primárias, por exemplo, o acidente vascular ou câncer. Os problemas gastrointestinais, particularmente as patologias do cólon e a doença celíaca (veja o caso do capítulo 10), ou condições pós-operatórias, estão associados a problemas nutricionais específicos. A desnutrição também afeta um vasto grupo de indivíduos idosos. No Reino Unido, até 40% dos pacientes admitidos nos hospitais estão desnutridos. Além da desnutrição, deficiências específicas como aquelas da vitamina D, ferro e vitamina C podem ocorrer.

Existem dois tipos de desnutrição proteico-calórica: marasmo e kwashiorkor

O *marasmo* ocorre em função de uma ingestão inadequada prolongada de calorias e proteína. É uma condição crônica, a qual se desenvolve após meses ou anos. É caracterizado pela perda do tecido muscular e da gordura subcutânea, com a preservação da síntese das proteínas viscerais, como a albumina. Há uma clara perda de peso.

O *kwashiorkor* é uma forma mais aguda de subnutrição, que pode ocorrer subjacente ao marasmo. Ela também se desenvolve em função da ingestão nutricional inadequada após trauma ou infecção. No kwashiorkor, ao contrário do marasmo, os órgãos não são poupados: a marca registrada do kwashiorkor é o edema, por causa da baixa concentração plasmática de albumina e da diminuição da pressão oncótica (Cap. 23). O edema pode mascarar a perda de peso. As complicações do kwashiorkor são a desidratação, hipoglicemia, hipotermia, distúrbios eletrolíticos e sepse. Estes pacientes têm sua imunidade e a cicatrização prejudicadas, e estão pré-dispostos às infecções.

A classificação de desnutrição da Organização Mundial de Saúde é baseada na antropometria e na presença bilateral de edema depressível. Outra classificação foi proposta, na qual há distinção entre a desnutrição com complicações e a desnutrição sem complicações (Tabela 22.7). O marasmo e o kwashiorkor são termos raramente usados na prática hospitalar nos países desenvolvidos; desnutrição e desnutrição com complicações são provavelmente mais apropriadas.

Tabela 22.7 Classificação da desnutrição.

	Moderada	Grave	Complicada
Peso por altura (% da mediana)	70–80	<70	<80
– ou edema depressível	não	sim	sim
– ou circunferência do braço parte média superior	110–125	<110 mm	<110 mm
Apetite, clinicamente bem, alerta	sim	sim	não*

Note que na classificação clássica da desnutrição, a presença do edema é também a principal característica de diferenciação entre o marasmo e o kwashiorkor.

Pacientes com desnutrição complicada podem desenvolver anorexia, febre alta, anemia e desidratação. Colins S, Yates R. The need to upgrade the classification of acute malnutrition. Lancet 2003;362**:249.*

O tratamento inapropriado de uma pessoa desnutrida pode levar à sindrome de realimentação

O tratamento de pacientes com desnutrição em áreas em que há falta grave de alimentos inclui preparações-padrão como o leite terapêutico Fórmula 100 (F100). A F100 é uma dieta líquida com conteúdo energético de 100 kcal/100 mL. Ela inclui leite desnatado em pó, óleo, açúcar e uma mistura de vitaminas e minerais (sem ferro). Nas áreas em que há falta grave de alimentos, os programas comunitários de alimentação usam as chamadas rações gerais de sobrevivência (pelo menos 2.100 kcal; 8.786 kJ/dia) contendo grãos, legumes e óleos vegetais. O tratamento da desnutrição deve incluir também o fornecimento adequado de água, tratamento básico de saúde e condições de saneamento mínimas.

HOMEM OBESO COM DIABETES TIPO 2, DOENÇA CORONARIANA E ARTRITE

O sr. K é um homem de 55 anos de idade com diabetes tipo 2 e doença coronariana. Ele apresenta angina de esforço e também sofre de dor artrítica intensa no joelho. Quando ele se apresentou inicialmente no ambulatório, seu peso era de 140 kg e sua altura era 1,80 m (IMC de 43). Dentro de um ano ele conseguiu perder 12 kg, com dieta. Ele teve a prescrição de um inibidor de lipase, o qual foi bem-tolerado. No entanto, sua artrite piorou e ele se tornou progressivamente menos capaz de se exercitar. Em função disto, seu peso aumentou novamente para 137 kg. Ele foi encaminhado para a equipe cirúrgica e agora está sendo considerado para cirurgia gástrica (banda gástrica).

Comentário. Este paciente ilustra múltiplos problemas associados à obesidade, e em particular como uma doença concomitante pode interferir nos programas de redução de peso. A perda de peso é substancialmente dependente do nível de exercício. Este paciente perdeu peso inicialmente, mas a manutenção do baixo peso corporal foi comprometida pela mobilidade reduzida causada pela artrite.

É importante ter paciência ao tratar nutricionalmente uma pessoa desnutrida. A reposição alimentar muito rápida pode ser perigosa, em função de uma mudança relevante entre o fluido intracelular e o extracelular. Isso é conhecido como síndrome de realimentação e é caracterizado por

uma diminuição aguda das concentrações séricas de magnésio, fosfato e potássio (o último por causa do estímulo à produção de insulina). Além disso, se há uma deficiência de tiamina, a alimentação com carboidratos pode desencadear a síndrome de Wernicke-Korsakoff (Cap. 11). Refeições simples e frequentes, em curtos intervalos de tempo, são recomendadas durante a recuperação do estado desnutrido. Num ambiente hospitalar, são requeridas a introdução gradual do suporte nutricional, bem como monitoramento atento.

OBESIDADE

A obesidade se tornou um problema de saúde mundialmente relevante

A obesidade mundial aumentou mais de 70% desde 1980. Nos Estados Unidos, 61% dos adultos estão acima do peso e 26% são obesos (informe do National Center for Health Statistics dos Estados Unidos, de 2002). As principais causas disto parecem ser a ampla disponibilidade de alimentos altamente calóricos e a recente e significativa redução da atividade física tanto no trabalho quanto no tempo livre. Há também uma pré-disposição genética à obesidade: na grande maioria dos casos, aparenta ser poligênica. Mais de 50 regiões cromossômicas são citadas por conter genes relacionados à obesidade. Mutações raras em pelo menos seis genes humanos, incluindo a leptina, têm sido ligadas à obesidade mórbida.

A obesidade está associada a um maior risco de problemas médicos e cirúrgicos

A obesidade está associada a um risco aumentado para várias doenças (Tabela 22.8). Em particular, é um fator de risco para diabetes melito tipo 2 (Cap. 21); o aumento da incidência mundial de diabetes acompanha o aumento da obesidade. A resistência à insulina, que se desenvolve na obesidade, é um importante denominador comum entre a obesidade e o diabetes. A síndrome metabólica, intimamente relacionada à obesidade (Cap. 21), associa-se a um maior risco de doença cardiovascular.

Tabela 22.8 A obesidade está associada ao aumento do risco diversas patologias.

A obesidade está associada ao aumento do risco de diversas patologias
Diabetes tipo 2
Hipertensão e acidente vascular cerebral
Dislipidemia
Pedras na vesícula biliar, particularmente em mulheres
Alguns tipos de câncer: mama, endométrio, ovários, vesícula biliar, cólon
Distúrbios respiratórios
Distúrbios musculoesqueléticos (no entanto, diminuição do risco de

osteoporose)
Problemas psicológicos

DIETA NA SAÚDE E NA DOENÇA

O histórico dietético deve incluir mais do que detalhes sobre a ingestão alimentar

Os hábitos dietéticos incluem os padrões de refeição, a quantidade e a composição dos alimentos. A dieta individual é determinada por fatores biológicos, psicológicos, sociológicos e culturais. Os fatores biológicos envolvidos são o estado dos sistemas responsáveis pela ingestão, digestão, absorção e metabolismo dos nutrientes. As deficiências enzimáticas, como a da lactase (Cap. 10), causam prejuízo na absorção dos alimentos (neste caso, do leite).

Os fatores psicológicos têm um papel importante na determinação da ingestão alimentícia; os distúrbios alimentares como a anorexia nervosa e a bulimia podem levar à desnutrição grave. Os fatores sociológicos incluem a disponibilidade e o preço dos alimentos, além de medidas tomadas pela sociedade para melhorar dietas como as refeições escolares e as refeições subsidiadas para população idosa ou carente. Os fatores culturais também determinam os padrões de alimentação e os tipos de alimentos preferidos. Todas estas considerações são importantes quando se avalia o histórico nutricional/dietético. A ingestão dietética individual pode ser avaliada por questionários de frequência alimentar, recordação dietética de 24 horas, registros alimentares e também pela análise direta dos alimentos e dos estudos de balanço metabólico. O novo método na pesquisa dietética é a chamada avaliação estruturada dos padrões dietéticos.

As recomendações dietéticas atuais para a população em geral é focada na alimentação balanceada

Um exemplo de recomendações dietéticas para uma população saudável é a Pirâmide Alimentar, desenvolvida pelo departamento de agricultura dos Estados Unidos (Fig. 22.9). Essas recomendações sugerem a ingestão de uma ampla variedade de alimentos. Eles enfatizam o equilíbrio entre a ingestão de alimentos e a atividade física, além de recomendar uma dieta plena em carboidratos complexos na forma de grãos, vegetais e frutas. A dieta deve conter poucas gorduras saturadas e colesterol e ser moderada na quantidade de açúcares, sal e sódio. O álcool deve ser ingerido com moderação. A Pirâmide Alimentar consiste em vários grupos de alimentos que devem ser ingeridos diariamente, de maneira a reduzir o número de porções diárias.

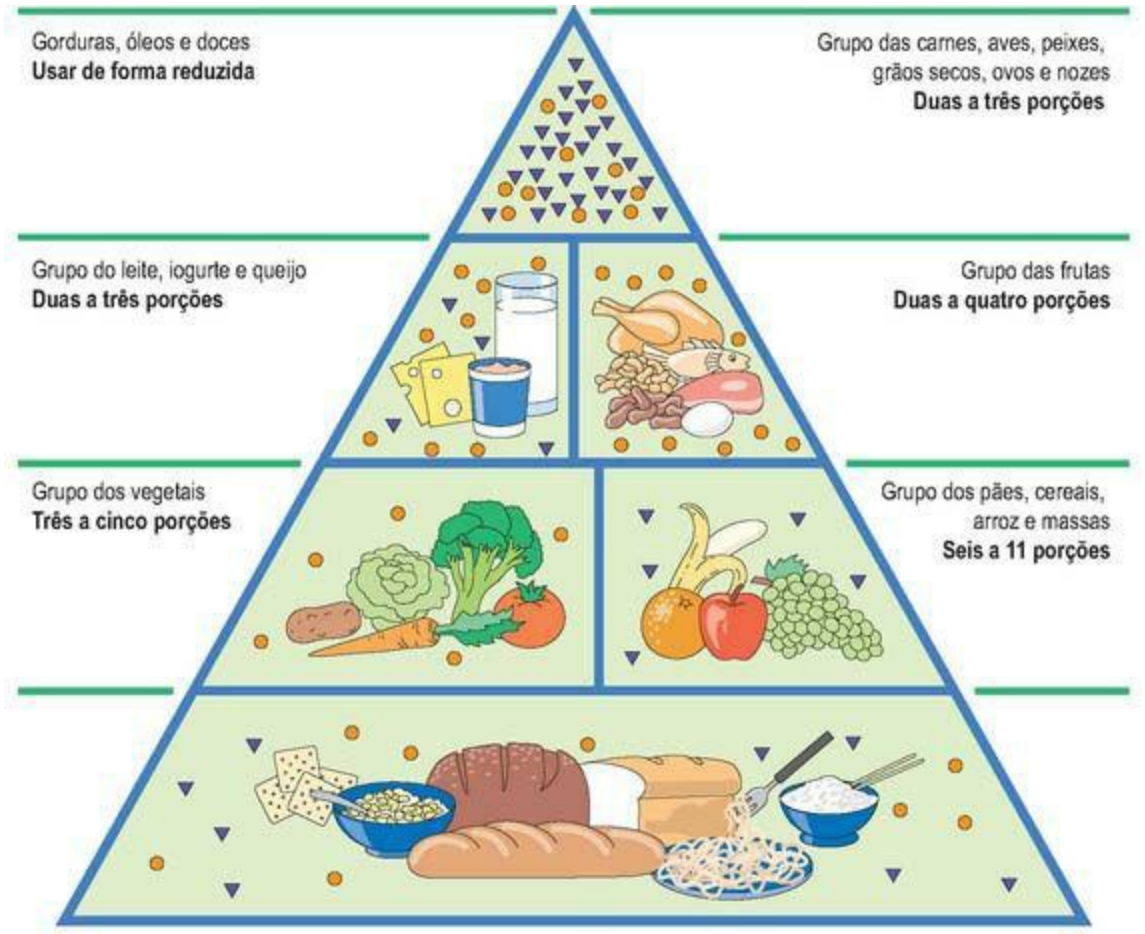


Fig. 22.9 A Pirâmide Alimentar. A pirâmide ilustra as recomendações atuais para a alimentação saudável (departamento de agricultura dos Estados Unidos).

- O grupo dos pães, massas e cereais constituem a base da nutrição, com seis a 11 porções recomendadas.
- Frutas (duas a quatro porções) e vegetais (três a cinco porções).
- Leite, iogurte e queijo (duas a três porções).
- Carne vermelha, aves, peixes, grãos secos, ovos e nozes.
- Gorduras, óleos e doces (devem ser consumidos com moderação).

Redução de peso

A redução de peso aumenta a expectativa de vida, diminui a pressão arterial, diminui a deposição de gordura visceral, melhora a concentração plasmática de lipídios, aumenta a sensibilidade à insulina e normaliza a glicemia, melhora a função das plaquetas e a coagulação, e aumenta a qualidade de vida.

Para perder peso, há necessidade de se alterar o equilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto, ou seja, entre a ingestão alimentar e a atividade física. No entanto, o processo envolve muitos outros fatores, como motivação, tempo disponível, custo e acesso a programas apropriados de redução de peso. Dietas pouco calóricas contêm aproximadamente 1.200-1.300 kcal/dia e dietas muito pouco calóricas contêm aproximadamente 800 kcal/dia. Geralmente, uma combinação de dieta e exercícios é mais efetiva na indução da perda de peso do que a dieta isolada. Na obesidade aguda, o tratamento com inibidores da absorção de lipídios e com antagonistas do sistema de receptores de endocanabinoides têm sido usado. Os tratamentos cirúrgicos como a banda gástrica e a cirurgia de *bypass* jejuno-ileal podem ser considerados em casos extremos (Fig. 22.10).



Fig. 22.10 **Tratamento cirúrgico da obesidade aguda**. Estas fotos mostram a mesma paciente antes e após a cirurgia de banda gástrica. Seu peso antes da cirurgia era de 136,1 kg; em três anos diminuiu para 63 kg. Cortesia da paciente e do Dr. Galloway, Cirurgião Consultor, Glasgow.

Dietas pobres em carboidrato para redução de peso

Dietas pobres em carboidratos, ricas em lipídios, aparentam ser efetivas na redução de peso (quadro da pág. 191), pelo menos a curto prazo, e reduzem regularmente as concentrações plasmáticas de glicose. Como em muitos outros aspectos da conduta dietética, não existem evidências completas sobre tais dados. Há preocupações contínuas que incluem o risco potencial de anormalidades das funções hepática e renal, além dos efeitos a longo prazo do aumento da ingestão de gorduras sobre o risco cardiovascular. A pesquisa sobre o tema continua.

A dieta é importante na prevenção da doença coronariana

Os nutrientes que afetam a aterosclerose são o colesterol dietético, as gorduras saturadas e os ácidos graxos *trans*. A ingestão calórica excessiva e a obesidade subsequente também facilitam a aterosclerose. A ingestão de altas quantidades de colesterol e de gorduras saturadas diminui a expressão do receptor de LDL, mediado por um aumento no conteúdo intracelular de colesterol nos hepatócitos: isso leva a um aumento de concentração do colesterol plasmático (Cap. 17). Os alimentos que contêm ácidos graxos saturados (leite integral, queijo, manteiga e carnes vermelhas) são aterogênicas, quando em excesso. A premissa por trás das dietas pobres em colesterol é a que a expressão do receptor de LDL pode ser aumentada se o colesterol dietético for suficientemente baixo. A típica dieta ocidental contém aproximadamente 400-500 mg de colesterol por dia. A ingestão necessária para alcançar a redução do colesterol plasmático é muito menor – abaixo de 200 mg e até mesmo menor que 100 mg por dia.

Os nutrientes que aparentam ter função protetora contra a aterosclerose incluem os ácidos graxos poli-insaturados ricos em ω-6 (contido em óleos vegetais) eω-3 presente em peixes e em óleos de peixe, gorduras monoinsaturadas e fibras solúveis como as β -pectinas. Os ácidos graxos poli-insaturados reduzem a concentração plasmática de colesterol. Os ácidos graxos ω-3 reduzem os triacilgliceróis com a redução da síntese de VLDL e do aumento de seu catabolismo. Eles também são antitrombóticos: os óleos de peixe inibem a síntese de tromboxano e de PDGF, reduzem a viscosidade sanguínea e estimulam a fibrinólise. É interessante notar que parece que estes compostos estabilizam eletricamente o músculo cardíaco, prevenindo as arritmias e diminuindo a incidência de morte súbita na população acometida por infarto do miocárdio. As gorduras monoinsaturadas aumentam a concentração de HDL, aumentam a sensibilidade à insulina e diminuem a concentração plasmática de triacilgliceróis.

Dietas pobres em gordura e colesterol têm sido a marca registrada da prevenção cardiovascular

Tais dietas normalmente ocasionam uma redução de aproximadamente 10% no colesterol sérico, se aplicadas durante testes clínicos, e uma redução menor (em geral menor que 5%) quando aplicadas à população em geral. O álcool parece ser protetor contra a doença coronariana, mas quando ingerido em excesso ele traz muitos outros riscos, entre eles a obesidade. Infelizmente, as dietas pobres em lipídios tendem a ser ricas em carboidratos, quando o conteúdo de proteínas é mantido constante. Apesar das recomendações para o uso predominante de carboidratos complexos, em muitas populações, a ingestão de açúcares refinados constitui uma proporção elevada demais da ingestão dos carboidratos e isso acarreta a obesidade. As dietas ricas em carboidratos também podem levar à hipertrigliceridemia. Infelizmente, as dietas pobres em lipídios parecem diminuir o colesterol HDL em 10%-20%.

NUTRIÇÃO E DOENÇAS CRÔNICAS

O controle do diabetes está intimamente relacionado à nutrição

Para garantir o controle glicêmico ótimo, não apenas a qualidade e quantidade de comida, mas também o momento e a regularidade das refeições são importantes. É muito importante que, nas pessoas com intolerância à glicose, uma abordagem abrangente, incluindo a redução de peso, a redução da ingestão de açúcar e de gorduras, o aumento na ingestão de fibras e o aumento da atividade física, diminui o risco de desenvolvimento de diabetes.

Câncer

O estilo de vida e a dieta podem influenciar a incidência de câncer

A ingestão de grandes quantidades de frutas e vegetais parece proteger contra o câncer, possivelmente em função da presença de antioxidantes e fibras. Os laticínios também parecem ser protetores. Houve sugestões de que dietas ricas em gorduras poderiam aumentar o risco de câncer, mas as evidências epidemiológicas para tal fato são fracas. Em estudos clínicos, o β -caroteno, os retinoides (Cap. 11), as fibras e o cálcio não foram efetivos na prevenção do câncer. No entanto, outras evidências sugerem que a vitamina E previne o desenvolvimento de câncer de próstata e que o selênio é benéfico no câncer de próstata e colorretal.

Doença renal

Os fatores que contribuem para o desenvolvimento da desnutrição na insuficiência renal (uremia, Cap. 23) incluem, além da ingestão insuficiente de nutrientes, o aumento do catabolismo, a inflamação crônica e as mudanças endócrinas. É importante a manutenção da ingestão adequada de proteínas e calorias, e uma dieta pobre em potássio e fosfato é recomendada, em função da tendência à retenção de potássio e fosfato quando a função renal se deteriora.

Suporte nutricional

O suporte nutricional é necessário para um número substancial de pacientes hospitalizados e varia de uma simples assistência com refeições, dietas enriquecidas ou de consistência especial à nutrição enteral ou parenteral total (Tabela 22.9).

Tabela 22.9 Níveis de suporte nutricional.

Níveis de suporte nutricional
Dietas espedais
Assistência ao comer
Nutrição enteral (alimentação através de diferentes tubos alimentares: nasogástrico, nasoduodenal, gastrotomia e jejunostomia)
Nutrição parenteral (intravenosa)

Urn guia abrangente sobre o suporte nutricional pode ser consultado em http://www.nhsggc.org.uk/nutritionteam.

A nutrição enteral consiste em alimentar uma pessoa por meio de tubos especiais colocados no estômago ou no jejuno, enquanto a nutrição parenteral é essencialmente intravenosa. A nutrição enteral é apropriada quando há dificuldade na ingestão oral do alimento, mas o trato gastrointestinal funciona devidamente.

No entanto, quando o trato gastrointestinal não funciona, por exemplo, por obstrução intestinal ou pela remoção cirúrgica de grandes partes do intestino, a nutrição parenteral total é apropriada.

A nutrição parenteral total, apesar de, em muitos casos, salvar vidas, é um tratamento potencialmente associado a complicações causadas por infecções intravenosas (exige procedimentos estéreis rigorosos), além de problemas metabólicos. Por esta razão, o tratamento nutricional parenteral em hospitais é organizado por equipes multidisciplinares que incluem enfermeiras, cirurgiões, gastroenterologistas, nutricionistas, farmacêuticos e laboratoristas especializados.

Resumo

- A nutrição adequada é a base da saúde e do bem-estar, e a má nutrição aumenta a suscetibilidade à doença.

- A ingestão alimentar é controlada por um sistema neuroendócrino que responde a sinais gerados no tecido adiposo.

- O genótipo, a disponibilidade de alimentos, o estado de saúde e a atividade física são fatores que determinam o estado nutricional.

- As necessidades nutricionais mudam ao longo da vida.

- As principais categorias de alimentos são os carboidratos, as gorduras, as proteínas, as vitaminas e os minerais. O balanço hídrico está intimamente associado à nutrição.

- A avaliação do estado nutricional é uma parte importante da avaliação clínica geral. Ela inclui a avaliação da dieta atual, do histórico dietético, exame clínico e uma gama de testes bioquímicos e hematológicos.

- A desnutrição afeta grandes áreas dos países em desenvolvimento e nos países desenvolvidos é um problema entre os grupos sociais carentes e em pessoas hospitalizadas.

- A obesidade se tornou um problema de saúde mundialmente relevante.

- O suporte nutricional inclui a assistência graduada do auxílio nas refeições até a nutrição parenteral total.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Esquematize os processos que mantêm a homeostase energética.

2. Descreva o papel das diferentes classes de ácidos graxos na nutrição.

3. Liste os princípios de um programa de redução de peso.

4. Discuta situações em que a demanda nutricional aumentada pode desencadear a desnutrição.

5. Qual dieta você recomendaria para um paciente diabético?

Leituras sugeridas

Collins S, Yates R. The need to update the classification of acute malnutrition. *Lancet*. 2003;362:249.

Cota D. CXB1 receptors: emerging evidence for central and peripheral mechanisms that regulate energy balance, metabolism, and cardiovascular health. *Diabetes/Metabol Res Rev*. 2007;23:507-517.

Crowley VEF. Overview of human obesity and central mechanisms regulating energy homeostasis. *Ann Clin Biochem.* 2008;45:245-255.

Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients for the United Kingdom. Report of the Panel on Dietary Reference Values of the Committee on Medical Aspects of Food Policy Department of Health. London: TSO, 2003.

Eckel RH. Nonsurgical management of obesity. *N Engl J Med*. 2008;358:1941-1950.

Gidden F, Shenkin A. Laboratory support of the clinical nutrition service. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38:693-714.

James WPT. The fundamental drivers of the obesity epidemics. *Obesity Rev*. 2008;9(suppl 1):6-13.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404:635-643.

Mann J, McAuley K. Carbohydrates: is the advice to eat less justified for diabetes and cardiovascular health? *Curr Opin Lipidol*. 2007;18:9-12.

Munoz M, Breymann C, Garcia-Erce JA, et al. Efficacy and safety of intravenous iron therapy as an alternative/adjunct to allogeneic blood transfusion. *Vox Sang*. 2008;94:172-183.

Schneider BD, Leibold EA. Regulation of mammalian iron homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2000;3:267-273.

Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obesity Metabol*. 2007;9:813-839.

World Health Organization. Management of Severe Malnutrition: A Manual for Physicians and Other Senior Health Workers. Geneva: World Health Organization. 1999. http://Available online at: www.who.int/nut/documents/manage_severe_malnutrition_eng.pdf

Sites

Referências de Ingestão Dietética: Applications in Dietary Planning (2003). Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (IOM) of the National Academies. www.iom.edu.

Agência de Padronização de Alimentos do Reino Unido. http://www.Foodstandards.gov.uk.

American Dietetic Association. http://www.eatright.org.

A Pirâmide Alimentar. http://www.nal.usda.gov.

Equipe de Nutrição. http://www.nhsggc.org.uk/nutritionteam.

Homeostase da Água e de Eletrólitos

M.H. Dominiczak, M. Szczepanska-Konkel

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os compartimentos hídricos do corpo no adulto e a composição dos principais líquidos corporais.
- Explicar o papel da albumina no movimento da água entre o plasma e o espaço intersticial, incluindo as consequências da proteinúria.
- Descrever de que maneira o sódio influencia o movimento da água entre o espaço extracelular e intracelular.
- Explicar por que a bomba sódio-potássio ATPase é essencial para a hidratação normal da célula e comentar sobre as consequências de sua inibição.
- Descrever os fatores que afetam a concentração plasmática de potássio.
- Discutir as interações entre a homeostase do sódio e da água.
- Descrever a avaliação clínica das condições hidroeletrolíticas.

INTRODUÇÃO

A água e os eletrólitos são constantemente trocados com o ambiente, e o conteúdo dos mesmos no corpo depende do balanço entre a ingestão e a perda.

A água é essencial para a sobrevivência e corresponde a aproximadamente 60% do peso corporal no adulto. Esta porcentagem modifica com a idade: é cerca de 75% no recém-nascido e diminui para menos de 50% nas pessoas mais idosas. O tecido cerebral é o que possui maior quantidade de água (quase 90%) e o tecido adiposo, a menor (10%).

A estabilidade das estruturas subcelulares e as atividades de diversas enzimas são dependentes de uma hidratação celular adequada. Tanto a deficiência quanto o excesso de água prejudicam a função de tecidos e órgãos. O equilíbrio da água e sua distribuição entre as células e o fluido extracelular circundante estão sujeitos a uma complexa regulação.

A manutenção dos gradientes iônicos e do potencial elétrico através das membranas também é crucial para a sobrevivência e para a contração muscular, condutibilidade neuronal e processos secretórios (Cap. 8). Os rins exercem uma importante função na regulação do equilíbrio hídrico e eletrolítico. Alterações eletrolíticas e hídricas são comuns na prática clínica.

ÁGUA

Compartimentos hídricos do corpo

Aproximadamente dois terços da água corporal total se encontram no líquido intracelular (LIC) e um terço permanece no líquido extracelular (LEC). O LEC consiste no líquido intersticial e na linfa (15% do peso corporal), plasma (3% do peso corporal) e líquidos transcelulares, que incluem o líquido gastrointestinal, urina e líquido cefalorraquidiano (LCR) (Fig. 23.1). Duas "barreiras" são importantes para o entendimento das trocas que ocorrem entre diferentes compartimentos: a membrana celular e a parede do capilar.

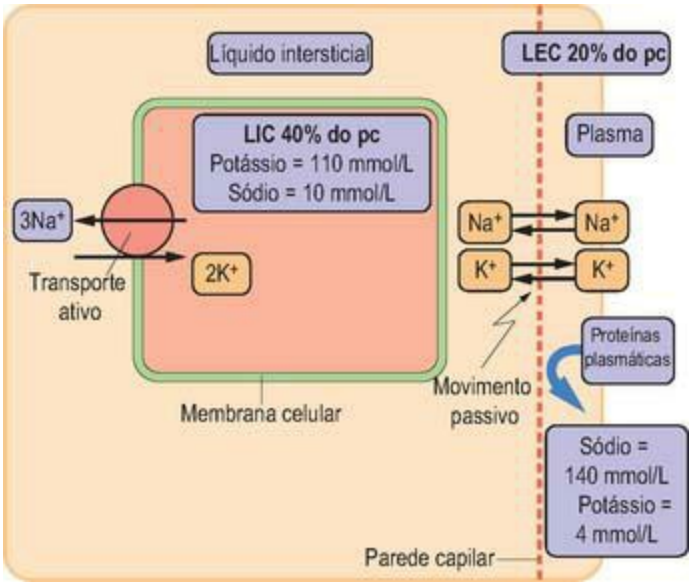


Fig. 23.1 Distribuição de água, sódio e potássio no organismo. Os principais compartimentos de água no corpo são o líquido intracelular (LIC) e o líquido extracelular (LEC). O LEC inclui o líquido intersticial e o plasma. O gradiente de concentração de sódio e potássio é mantido através das membranas celulares pela bomba de Na^+/K^+-ATPase. O sódio é o principal contribuinte para a osmolalidade do LEC e um determinante da distribuição de água entre o LEC e o LIC. A distribuição de água entre o plasma e o líquido intersticial é determinada pela pressão oncótica exercida pelas proteínas plasmáticas. pc, peso corporal.

A parede do capilar separa o plasma do líquido intersticial

A parede do capilar separa o plasma do fluido intersticial e é livremente permeável à água e eletrólitos, mas não às proteínas. Íons e moléculas de baixo peso molecular estão presentes em concentrações semelhantes no LEC e no plasma, mas a concentração de proteínas no plasma é quatro a cinco vezes maior do que a do líquido intersticial. A concentração plasmática total de cátions é de cerca de 150 mmol/L, dos quais o sódio é aproximadamente 140 mmol/L e o potássio 4 mmol. Os ânions plasmáticos mais abundantes são o cloreto e o bicarbonato, com concentrações médias de 100 mmol/L e 25 mmol/L, respectivamente (Fig. 23.2). Considera-se, para fins de equilíbrio eletrolítico, que o restante dos ânions, em conjunto, constitua o chamado *anion gap*, que é calculado da seguinte maneira:

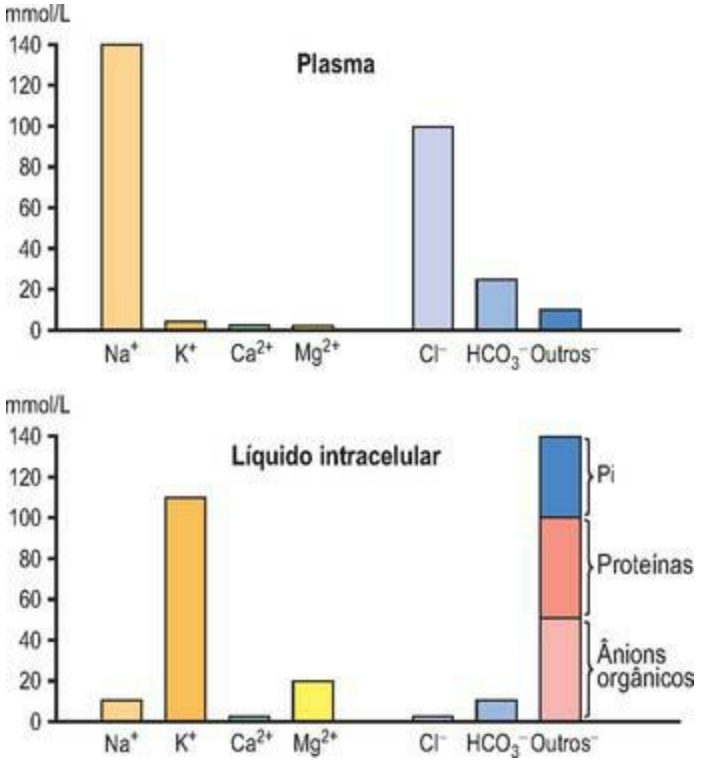


Fig. 23.2 Íons presentes no plasma e no líquido intracelular. Os íons mais importantes no plasma são sódio, potássio, cálcio, cloreto, fosfato e bicarbonato. O cloreto de sódio, numa concentração próxima de 0,9% (portanto, "fisiológica"), é o principal componente iônico do LEC. O potássio é o principal cátion intracelular. A glicose e a ureia contribuem para a osmolalidade plasmática. Normalmente, sua contribuição é pequena, porque estão presentes no plasma em concentrações molares relativamente pequenas (cerca de 5 mmol/L cada). Contudo, quando a concentração de glicose aumenta no diabetes, sua contribuição para a osmolalidade se torna importante. A concentração plasmática da ureia aumenta na insuficiência renal, mas ela não contribui para o movimento de água entre o LEC e o LIC porque atravessa livremente as membranas celulares. O principal cátion intracelular é o potássio e os principais ânions são os fosfatos e as proteínas. Existe também uma quantidade substancial de magnésio nas células.

$$\textit{Anion gap} = \{[Na^+] + [K^+]\} - \{[Cl^-] + [HCO_3^-]\}$$

O *anion gap* inclui o fosfato, sulfato, proteína e ânions orgânicos como lactato, citrato, piruvato, acetoacetato e 3-hidroxibutirato. Numa pessoa saudável, o *anion gap* é aproximadamente 10 mmol/L. Contudo, pode aumentar diversas vezes em condições nas quais se acumulam ânions inorgânicos e orgânicos, por exemplo, na insuficiência renal ou na cetoacidose diabética. Por este motivo, ele é importante clinicamente.

A membrana plasmática separa o líquido intracelular do extracelular

No LIC, o principal cátion é o potássio, presente numa concentração próxima de 110 mmol/L, o que é quase 30 vezes acima do que encontramos no LEC e no plasma (4 mmol/L). Os principais ânions no LIC incluem proteínas e fosfato.

No LEC, a situação é inversa: o principal cátion é o sódio, presente numa concentração próxima de 145 mmol/L. No LIC a concentração de sódio (e cloreto) é cerca de apenas 10 mmol/L.

A água se difunde livremente através da maioria das membranas celulares, mas o movimento de íons e de moléculas neutras é restrito.

Pequenas moléculas são transportadas através de membranas por proteínas transportadoras específicas, as bombas iônicas. A mais importante é a sódio/potássio ATPAse (Na^+/K^+-ATPase), também conhecida por bomba sódio-potássio.

A Na+/K+-ATPase mantém os gradientes de sódio e de potássio através da membrana

celular

A bomba de Na^+/K^+-ATPase é a principal determinante da concentração citoplasmática de sódio (Cap. 8). Ela exerce uma função importante na regulação do volume celular, do pH citoplasmático e dos níveis de cálcio por meio dos transportadores Na^+-H^+ e Na^+-Ca^{2+}. Um dos primeiros requisitos para adaptações realizadas pela bomba de sódio vem de alterações no sódio e no potássio da dieta. Hormônios que controlam o volume e a composição iônica do LEC normalmente agem diretamente na bomba de sódio no rim e no intestino. Como os transportes de água e sódio através do epitélio encontram-se invariavelmente ligados, a função da bomba de sódio também é crítica para a absorção de água no intestino e reabsorção de água no rim. O mau funcionamento na bomba de sódio no rim e no duodeno está ligado a fisiopatologia da hipertensão e diarreia crônica, respectivamente.

A bomba de Na^+/K^+ATPase pode ser considerada ou como um transportador de íons (bomba de sódio), ou como uma enzima (ATPase). Ela mantém o potencial elétrico e o gradiente químico (eletrogênica) através da membrana (Fig. 23.3). Ela hidrolisa uma molécula de ATP e a energia liberada é utilizada para transferir três íons de sódio para fora da célula e colocar dois íons de potássio no interior da mesma (Fig. 23.4). Ela é ativada por sódio e ATP nos sítios citoplasmáticos. A estrutura da subunidade catalítica da enzima e seus locais de fosforilação são vistos na Figura 23.5. Metade da ativação máxima da enzima pelo sódio intracelular ocorre na faixa de concentração de sódio de 10-40 mM, o que está, frequentemente, acima da concentração encontrada no estado de equilíbrio. Portanto, pequenas alterações no sódio citoplasmático podem ter efeitos importantes na atividade da Na^+/K^+-ATPase. Alguns hormônios parecem alterá-la mudando a afinidade aparente da enzima pelo sódio (p. ex., esta afinidade é aumentada pela angiotensina II e pela insulina).

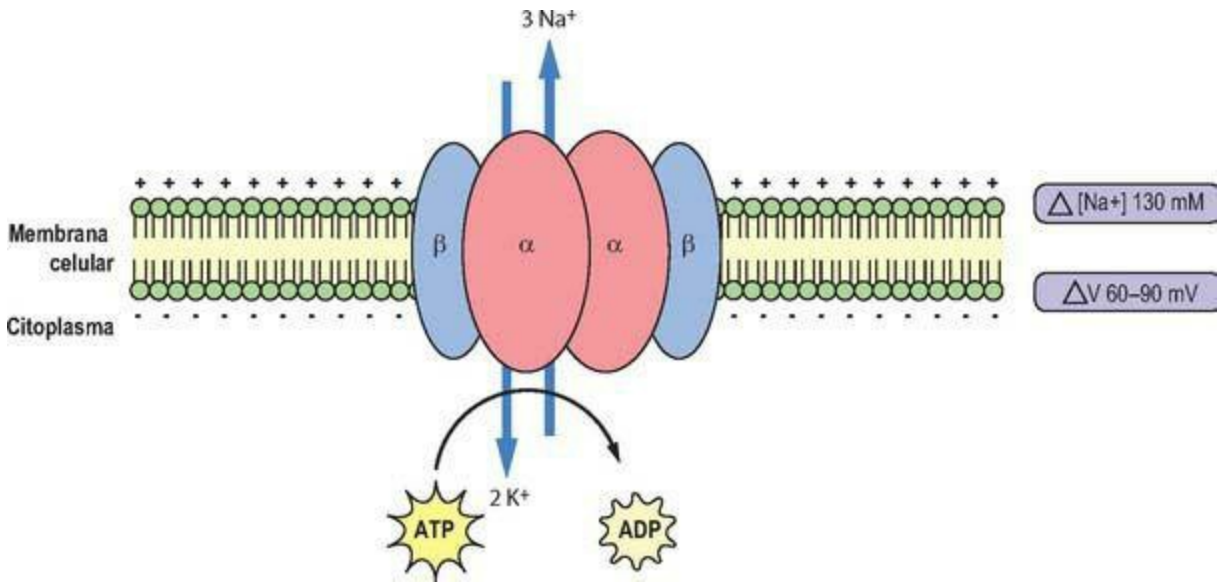


Fig. 23.3 A Na^+/K^+-ATPase (bomba de sódio-potássio) gera um potencial transmembrana e um gradiente de concentração iônica através das membranas celulares. Para cada molécula de ATP hidrolisada, são movidos dois íons potássio para o interior da célula e três íons sódio para fora da célula. A Na^+/K^+-ATPase consiste em duas subunidades principais – subunidade catalítica (α) e subunidade estrutural (β).

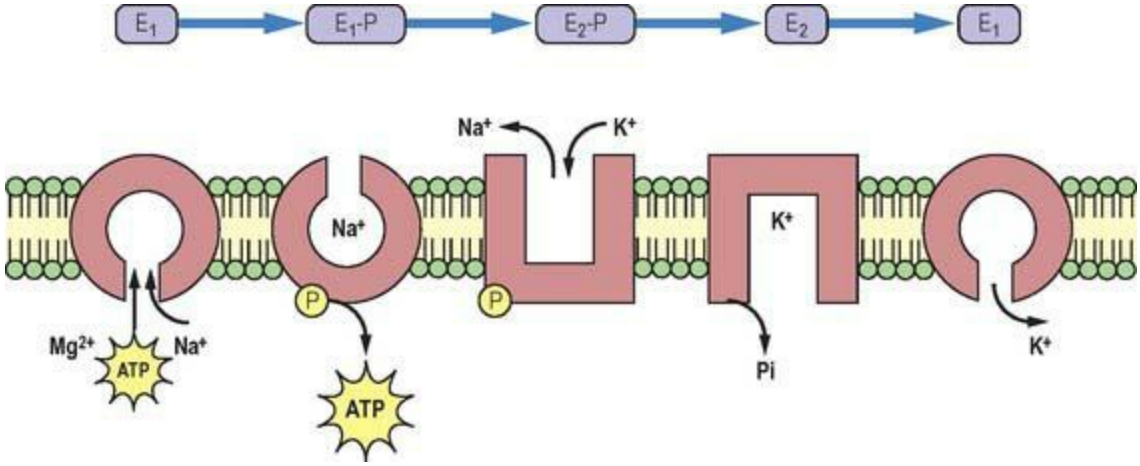


Fig. 23.4 Função catalítica da Na^+/K^+-ATPase. A subunidade catalítica da Na^+/K^+-ATPase pode estar fosforilada (E1-P e E2-P) ou defosforilada (E1 e E2) e isto altera sua conformação e afinidade pelos substratos. A forma E1 exibe alta afinidade para o ATP, magnésio e sódio e baixa afinidade para o potássio, enquanto a forma E2 exibe alta afinidade para o potássio e baixa para o sódio. Após a liberação do ADP, ocorre mudança conformacional de E1-P para E2-P. Isto promove a liberação do sódio para o meio extracelular e a ligação do potássio extracelular. Este último processo induz defosforilação de E2-P e liberação do potássio no compartimento intracelular.

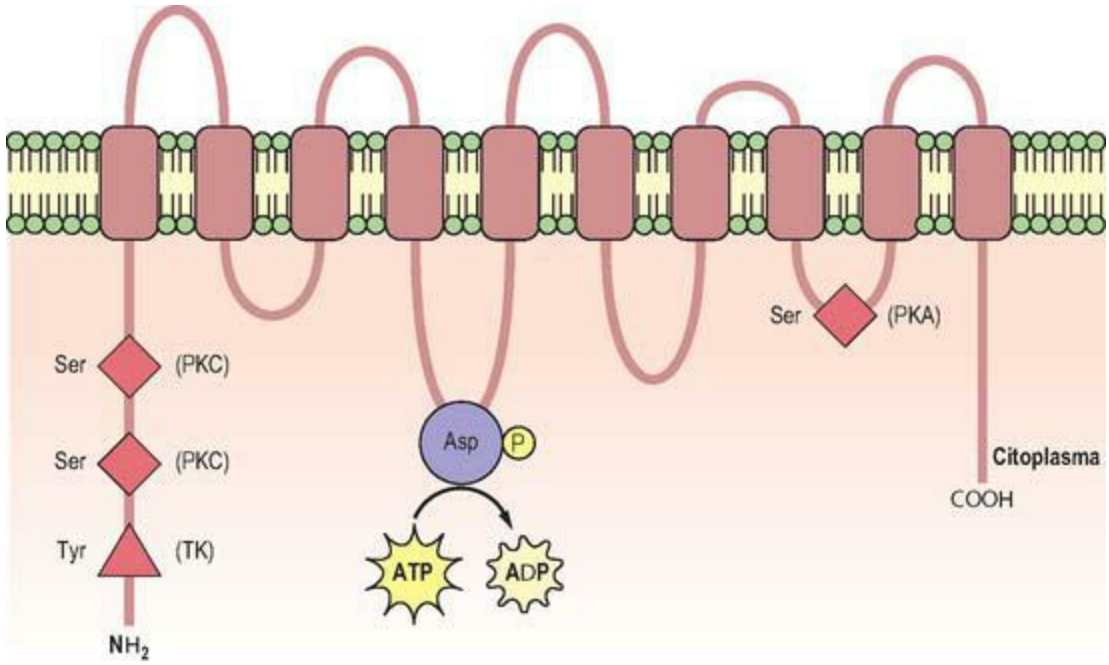


Fig. 23.5 Estrutura da subunidade α da Na^+/K^+-ATPase. A subunidade α consiste em 10 domínios transmembrana (M1-M10) com os domínios amino e carboxiterminais intracelulares. O domínio que liga o ATP e o local de fosforilação estão localizados na longa alça citoplasmática M4-M5 (onde o resíduo de Asp é fosforilado). Outros locais de fosforilação, em resíduos de serina e tirosina, são mediados pela proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC) e tirosina quinase (TK).

O movimento passivo de eletrólitos através de canais iônicos é direcionado por gradiente eletroquímico

Para a maioria das células, o potencial da membrana varia entre 50 e 90 mV, sendo negativo no interior das células. O gradiente eletroquímico é uma fonte de energia para o transporte de muitas substâncias como o cotransporte de íons sódio com glicose, aminoácidos e fosfato. A despolarização da membrana promove um aumento no cálcio intracelular pela ativação de canais de cálcio dependente de voltagem (Cap. 8). A função do gradiente de íons na transmissão nervosa encontra-se descrita no capítulo 42.

OSMOLALIDADE

A osmolalidade depende da concentração de moléculas na água. Todas as moléculas dissolvidas na água corporal contribuem para a pressão osmótica, a qual é proporcional à concentração molal de uma solução. Um milimol de uma substância diluída em um 1 kg de H_2O a 37°C exerce uma pressão osmótica de aproximadamente 19 mmHg. Sob condições fisiológicas, a concentração média de todas as substâncias osmoticamente ativas no LEC é de 290 mmol/kg/H_2O. Normalmente, a osmolalidade do LIC é idêntica.

OS LÍQUIDOS CORPORAIS DIFEREM EM SUA COMPOSIÇÃO IÔNICA

Anormalidades clínicas que podem se desenvolver após perda de líquidos corporais dependem da composição do que é perdido. Por exemplo, o líquido perdido na transpiração contém menos sódio que o líquido extracelular: portanto, a transpiração excessiva leva a uma perda predominante de água e concentra o sódio no líquido extracelular, causando hipernatremia. Por sua vez, o teor do sódio do líquido intestinal é similar ao do plasma, mas contém quantidades consideráveis de potássio. Assim, a perda de líquido intestinal (p. ex., na diarreia grave) resulta em desidratação e hipocalemia, mas pode não afetar a concentração de sódio plasmático (Tabela 23.1).

Tabela 23.1 Composição iônica dos líquidos corporais. Perda de líquido corporal com conteúdo eletrolítico semelhante ao do plasma leva à desi-dratação com concentração normal de eletrólitos no plasma. Por sua vez, quando o conteúdo de sódio no líquido perdido é menor que o do plasma (p. ex., suor), a desidratação pode ser acompanhada de hipernatremia. A hiper-hidratação é geralmente acompanhada de hiponatremia. Conteúdo eletrolítico dos líquidos corporais.

	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)	Bicarbonato (mmol/L)	Cloreto (mmol/L)
Plasma	140	4	25	100
Suco gástrico	50	15	0–15	140
Fluido do intestino delgado	140	10	variável	70
Fezes na diarreia	50–140	30–70	20–80	variável
Bile, líquido pleural e peritoneal	140	5	40	100
Suor	12	10	–	12

O movimento da água entre o líquido intracelular e extracelular se dá pela diferença na osmolalidade

Uma mudança na concentração de íons osmoticamente ativos em um dos dois compartimentos cria um gradiente de pressão osmótica e, consequentemente, induz o movimento da água entre os compartimentos. A água sempre se difunde do compartimento de baixa osmolalidade para o de osmolalidade mais alta até igualar as pressões osmóticas.

Como o sódio é o íon mais abundante no LEC, ele é o principal determinante da osmolalidade deste compartimento. A glicose está normalmente presente no plasma numa concentração muito baixa para contribuir significativamente para a osmolalidade (5 mmol/L; 90 mg/dL), mas pode se tornar o principal determinante da osmolalidade quando sua concentração aumenta no diabetes (Cap. 21) (Fig. 23.6).

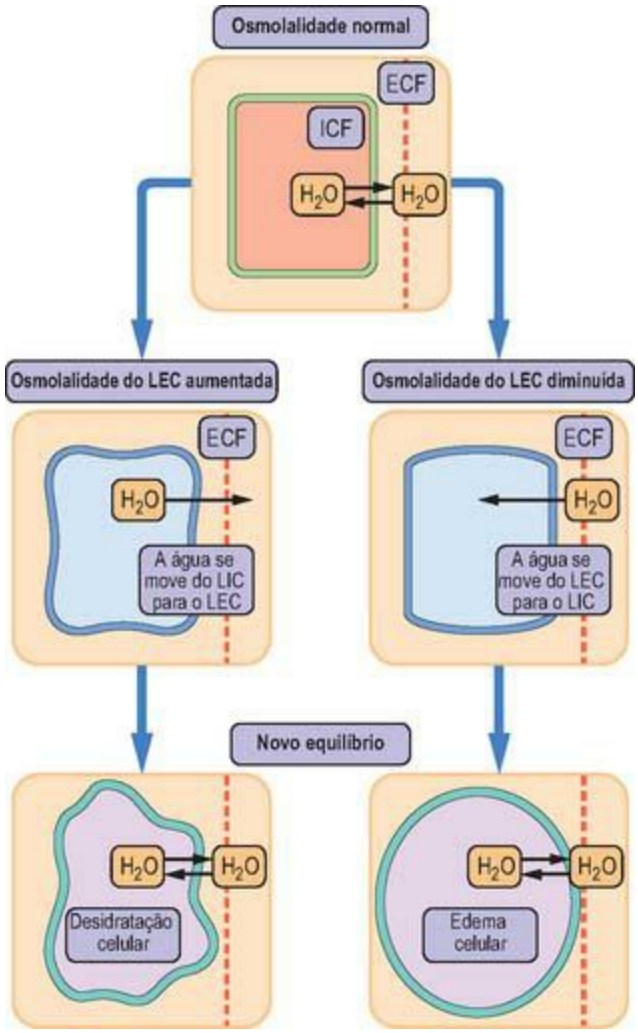


Fig. 23.6 Redistribuição de água causada por alterações na osmolalidade. A pressão osmótica controla o movimento de água entre os compartimentos. Um aumento na osmolalidade do LEC leva à retirada de água das células e desidratação celular. Por sua vez, quando a osmolalidade do LEC diminui, a água se move do LEC para as células, podendo causar edema celular. As setas indicam a direção do movimento da água.

A distribuição da água entre o plasma e o líquido intersticial depende da concentração das proteínas plasmáticas

As proteínas, especialmente a albumina, exercem pressão osmótica no plasma (cerca de 3,32 kPa; 25 mmHg), conhecida como pressão oncótica, que retém a água no leito vascular. Esta força é balanceada pela pressão hidrostática, a qual força o líquido para fora dos capilares. Na porção arterial dos capilares, a pressão hidrostática prevalece sobre a pressão oncótica e a água e substâncias de baixo peso molecular saem para o espaço extravascular. Em contrapartida, na porção venosa dos capilares, a pressão oncótica prevalece sobre a pressão hidrostática e o líquido é levado para o interior do vaso (Fig. 23.7). Uma redução na pressão osmótica do plasma, que ocorre, por exemplo, como consequência de uma redução na concentração plasmática de albumina, resulta em

movimento de líquido para o espaço extravascular e formação de edema.

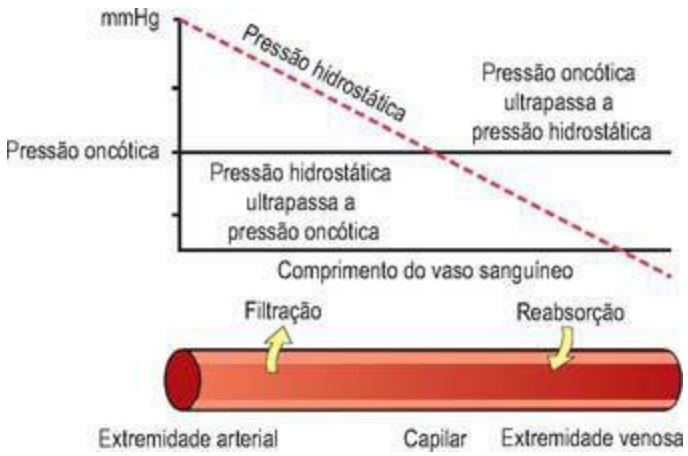


Fig. 23.7 As pressões oncótica e hidrostática determinam o movimento do líquido entre o plasma e o líquido intersticial.

As células se protegem contra alterações de osmolalidade e de volume

Um aumento na concentração intracelular de sódio estimula a atividade da Na^+/K^+-ATPase, que exclui íons sódio da célula. Desta maneira, as células se protegem de mudanças em seu volume. Outro mecanismo protetor do volume celular é a geração intracelular de substâncias osmoticamente ativas. Por exemplo, as células cerebrais se adaptam ao aumento da osmolalidade do LEC aumentando a sua concentração de aminoácidos, e as células na medula renal expostas a um ambiente hiperosmótico produzem álcool e sorbitol, osmoticamente ativos, e aumentam a concentração do aminoácido taurina.

O corpo constantemente realiza trocas de água com o ambiente

No estado de equilíbrio, a ingestão de água equivale à sua perda. A principal fonte de água é a ingestão oral e o principal mecanismo de perda é a excreção de urina. Perdemos também água pelos pulmões, transpiração e fezes: trata-se da chamada "perda insensível de água", que atinge cerca de 500 mL por dia (Fig. 23.8). A perda insensível de água pode aumentar substancialmente em temperaturas elevadas, durante exercício intenso, e também como consequência de diarreia ou febre.

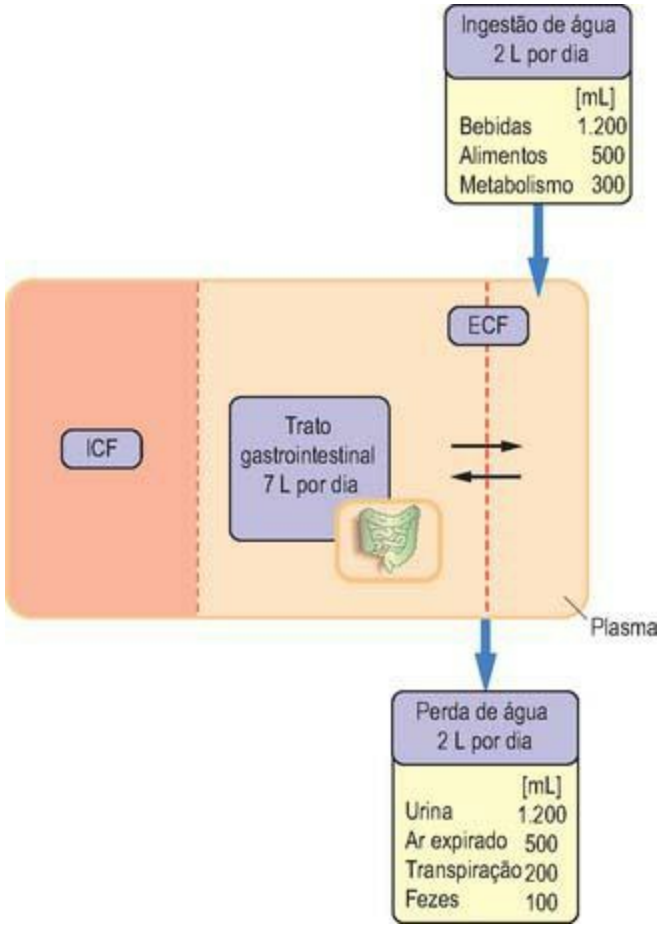


Fig. 23.8 Balanço hídrico diário numa pessoa adulta. A água é obtida da dieta e do metabolismo oxidativo e é perdida através dos rins, pele, pulmões e intestino. Observe o volume de água que entra e sai do trato gastrointestinal diariamente; isto explica por que uma diarreia grave leva rapidamente à desidratação.

O EDEMA RESULTA DE PERDA DE PROTEÍNAS

Uma menina com 8 anos de idade foi encaminhada a um nefrologista após ter apresentado edema de face e tornozelos por um período de cerca de duas semanas. A fita de teste para pesquisa de proteína na urina mostrou um resultado fortemente positivo (++++) e a dosagem de proteína na urina coletada por 24 horas mostrou excreção de proteína de 7 g/dia. O valor de referência para excreção de proteína urinária é inferior a 0,15 g/dia.

Comentário. A biópsia renal revelou a conhecida doença de lesão mínima. A causa da proteinúria foi uma alteração na barreira de filtração renal com perda de proteína urinária, causando, por sua vez, uma diminuição na pressão oncótica plasmática e retenção de água no LEC, levando ao edema. A condição entrou em remissão após tratamento com glicocorticoide.

RINS

Os rins mantêm a composição, osmolalidade e volume do LEC e também controlam o equilíbrio acidobásico

Os rins removem produtos do metabolismo como a ureia, ácido úrico e creatinina, eliminando-os na urina, e retêm substâncias como glicose, aminoácidos e proteínas. Eles também metabolizam e removem drogas e toxinas. A função do rim é regulada hormonalmente pela vasopressina (hormônio antidiurético; ADH) produzida na pituitária posterior e pelo sistema renina-angiotensina. Os próprios rins produzem calcitriol (1α-25-di-hidroxicolecalciferol; $1,25(OH)_2D_3$), envolvido na homeostase do cálcio (Cap. 25), e eritropoetina, que controla a produção de eritrócitos.

Os rins consomem grande quantidade de oxigênio, principalmente para manter o transporte ativo de sódio

A maioria dos processos metabólicos nos rins é aeróbica e, consequentemente, o consumo de oxigênio nos rins é elevado: é praticamente igual ao do músculo cardíaco e é três vezes maior do que o consumo do cérebro. Tal atividade metabólica elevada é necessária para manter a reabsorção tubular: cerca de 70% do oxigênio consumido é utilizado para manter o transporte ativo do sódio, que por sua vez determina a reabsorção da glicose e dos aminoácidos. Os principais substratos energéticos no córtex renal são ácidos graxos, lactato, glutamato, citrato e corpos cetônicos. As células tubulares renais com uma elevada atividade da Na^+/K^+-ATPase possuem diversas mitocôndrias junto à membrana plasmática, de modo que o ATP liberado no citosol é facilmente acessível.

A unidade funcional do rim é o néfron

Cada rim consiste em aproximadamente 1 milhão de pequenas estruturas chamadas néfrons (Fig. 23.9). Os glomérulos localizados no córtex renal são filtros biológicos conectando o plasma com os túbulos excretores. Os túbulos renais são divididos em túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor.

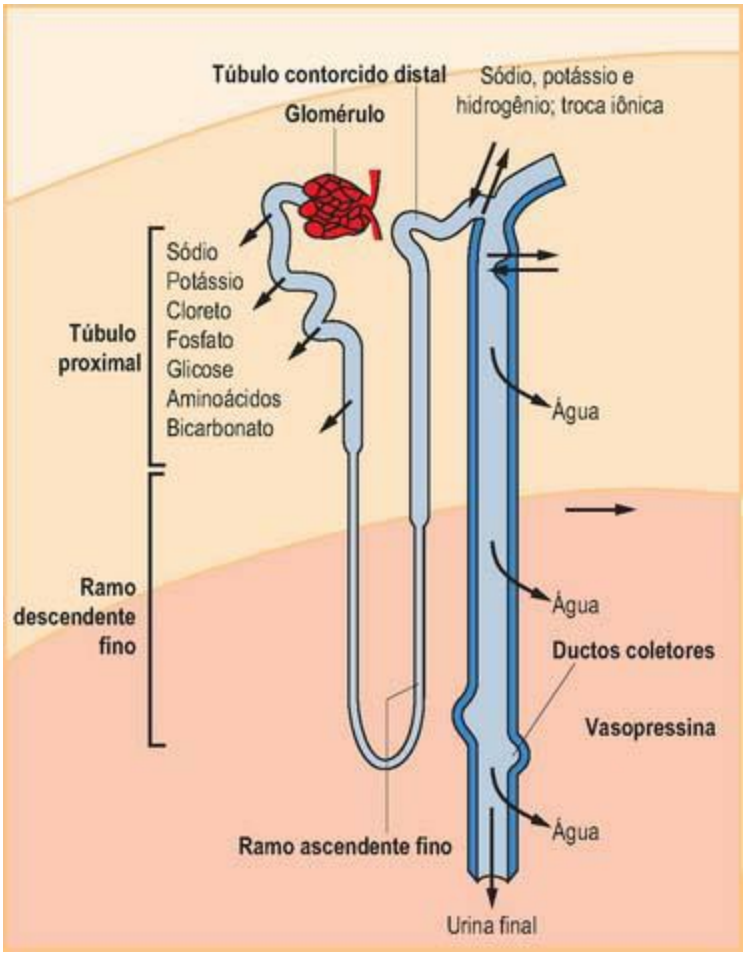


Fig. 23.9 O néfron e seus principais locais de transporte.

A filtração do plasma ocorre no glomérulo renal

A função excretora dos rins envolve filtração do plasma no glomérulo, transporte de água e solutos da luz tubular de volta para o sangue (reabsorção tubular), e secreção de diferentes substâncias pelas células tubulares na luz dos túbulos.

O plasma dos capilares glomerulares é filtrado para o interior do glomérulo, o espaço de Bowman. A filtração glomerular depende da superfície de filtração e da permeabilidade da barreira de filtração, que inclui as células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos glomerulares, a membrana basal, e as células epiteliais (podócitos) com seus característicos processos conhecidos como pedicelos (Fig. 23.10).

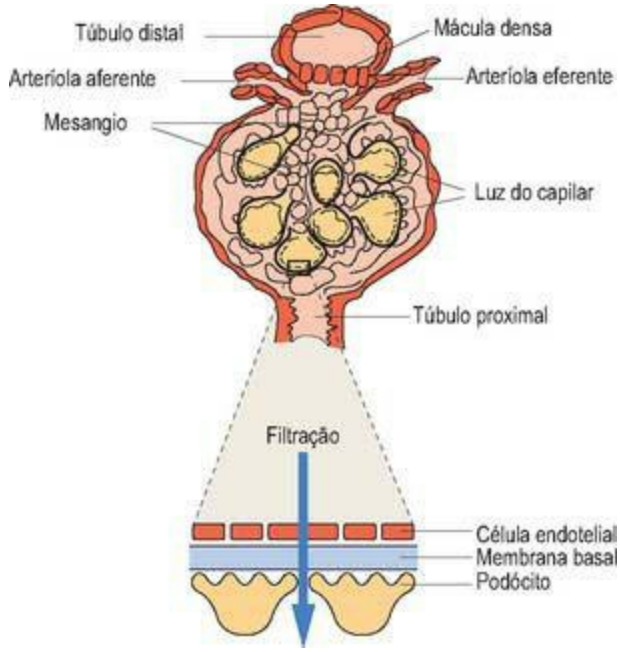


Fig. 23.10 Barreira de filtração glomerular. Esta consiste nas células endoteliais, membrana basal e os podócitos. As células da mácula densa fazem parte do aparelho justaglomerular: elas detectam a concentração de cloreto no túbulo distal e ajustam o diâmetro da arteríola aferente, regulando o fluxo sanguíneo glomerular.

O principal componente da membrana basal glomerular é o colágeno tipo IV que forma a rede de filamentos, proporcionando elasticidade e resistência à pressão hidrostática. A membrana também contém laminina, fibronectina e proteoglicanos contendo heparan sulfato, que possuem grupos carregados negativamente, os quais formam uma barreira eletrostática para proteínas do plasma.

Podócitos e células mesangiais possuem receptores para várias substâncias vasoativas como angiotensina II, vasopressina, bradicinina, ATP, endotelina, prostaglandinas, dopamina, peptídeos natriuréticos e nucleotídeos de adenina.

As fenestrações na camada endotelial e os espaços entre os pedicelos dos podócitos formam uma peneira que filtra água e pequenas moléculas. A filtração de moléculas maiores através desta barreira é limitada por seu tamanho, forma e carga elétrica. Por exemplo, em um pH de 7,4, a maioria das proteínas plasmáticas está carregada negativamente, assim como a barreira de filtração; isto dificulta a filtração até mesmo das menores proteínas como a mioglobina (peso molecular de 17 kDa) e impede quase completamente a filtração de proteínas de peso molecular maior como a albumina (69 kDa).

A filtração glomerular é conduzida pela pressão hidrostática nos capilares glomerulares, que é aproximadamente de 50 mmHg. A pressão hidrostática é neutralizada pela pressão oncótica do plasma e pela pressão contrária exercida pelo filtrado formado na cápsula de Bowman (aproximadamente 10 mmHg). Mudanças na taxa da filtração glomerular alteram a quantidade total da água e soluto filtrados, mas não a composição do filtrado. Uma redução na pressão sanguínea na arteríola aferente do glomérulo é detectada por um grupo de células do conhecido aparelho justaglomerular. Este estimula a secreção de renina e ativa o sistema renina-angiotensina.

O filtrado glomerular: formação da urina

O volume, a composição e a osmolalidade do filtrado glomerular são modificados durante seu fluxo através dos túbulos renais. Aproximadamente 80% do filtrado é reabsorvido no túbulo proximal. O sódio é reabsorvido por vários mecanismos: através de canal iônico específico, em troca pelo íon hidrogênio e em cotransporte com glicose, aminoácidos, fosfato e outros ânions. O movimento do sódio causa reabsorção de água. A entrada do sódio nas células dos túbulos proximais é passiva, o que é possível porque a Na^+/K^+- ATPase mantém a concentração do sódio baixa no citoplasma das células tubulares.

O líquido que deixa o túbulo proximal é isotônico. As diferentes características de permeabilidade das porções ascendente e descendente da alça de Henle mantêm a elevada osmolalidade da medula, o que é essencial para uma reabsorção eficiente da água; isto é conhecido como sistema de contracorrente (Fig. 23.11). O fluido que deixa a alça de Henle é diluído (hipotônico). Mais sódio é reabsorvido no túbulo distal e ducto coletor em troca de potássio ou íon hidrogênio. Este processo é controlado pela aldosterona (Fig. 23.12). A reabsorção de água no ducto coletor é controlada pela vasopressina (veja a seguir).

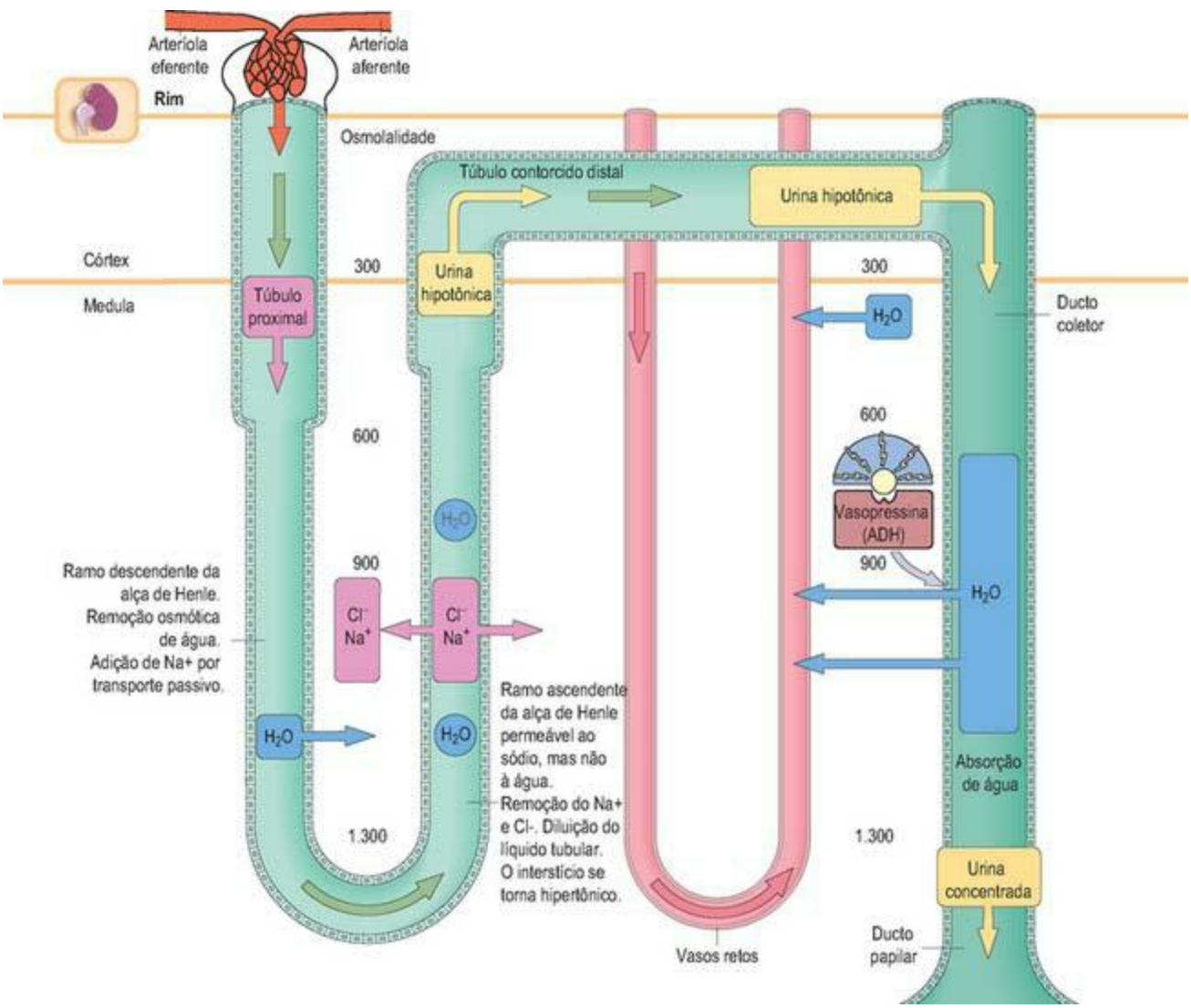


Fig. 23.11 Mecanismo de troca e multiplicação por contracorrente nos túbulos renais. O mecanismo de contracorrente é essencial na formação da urina e para a reabsorção de água no túbulo distal. No ramo ascendente da alça de Henle os íons sódio e

cloreto são bombeados para o líquido intersticial. Eles, então, se difundem livremente para a luz do ramo descendente, criando uma alça funcional que perpetua o aumento na osmolalidade do filtrado que alcança o ramo ascendente. Isto é conhecido como multiplicação por contracorrente. Como resultado disto, a osmolalidade do córtex renal é similar à do plasma (300 mmol/L), enquanto que na medula a osmolalidade pode chegar a 1.300 mmol/L. A elevada osmolalidade da medula facilita a reabsorção da água nos ductos coletores. Isto é conhecido como troca por contracorrente. A quantidade de água reabsorvida é controlada pela vasopressina.

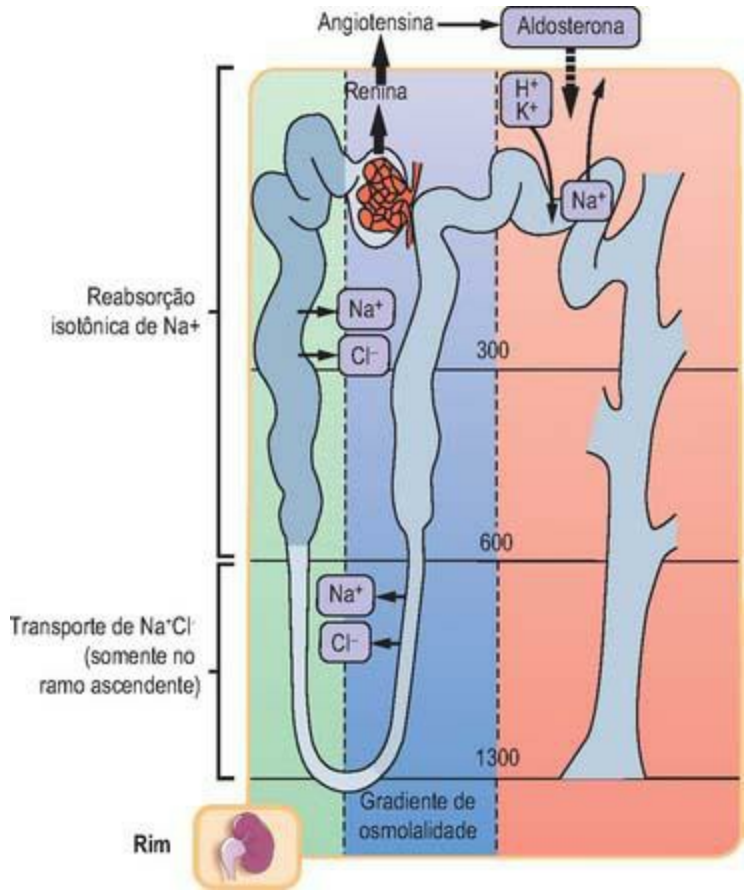


Fig. 23.12 Reabsorção de sódio nos túbulos renais. Mais de 80% do sódio filtrado é reabsorvido ativamente no túbulo proximal. Os íons sódio e cloreto são também reabsorvidos no ramo ascendente da alça de Henle. Um mecanismo diferente opera no túbulo distal, onde a reabsorção de sódio é estimulada pela aldosterona e está acoplada à secreção dos íons hidrogênio e potássio. A aldosterona induz retenção de sódio e aumento na excreção de potássio.

A Na+/K+- ATPase no rim

A atividade da Na^+/K^+-ATPase no rim é milhares de vezes maior do que em outros tecidos. No rim, sua maior função é permitir a reabsorção de sódio pela retirada de sódio da célula para o líquido intersticial. Existe uma relação estreita entre a quantidade de Na^+/K^+-ATPase e a capacidade de reabsorção de sódio nos diferentes segmentos do néfron. Nas células tubulares renais, como em todas as células que reabsorvem sódio, a Na^+/K^+-ATPase está presente na membrana basolateral.

Em humanos, o rim reabsorve cerca de 18 moles de sódio por dia e utiliza cerca de 6 moles de ATP para este processo. Portanto, a Na^+/K^+-ATPase é um transdutor que converte energia metabólica em gradiente iônico.

Regulação da atividade da Na+/K+-ATPase

A Na^+/K^+-ATPase está sujeita à regulação tanto de curta quanto de longa duração por vários hormônios, incluindo aldosterona (veja a seguir). A regulação de curta duração envolve tanto efeito direto sobre as propriedades cinéticas da enzima quanto a sua translocação entre a membrana plasmática e os estoques intracelulares. A regulação de longa duração afeta a síntese ou a degradação da enzima.

Hormônios peptídicos, como a vasopressina e o PTH, que agem por meio de receptores acoplados a proteínas G, também podem afetar a atividade da Na^+/K^+-ATPase. As proteínas G ativam a adenilato ciclase, a qual gera cAMP. O cAMP ativa a proteína quinase A (PKA). PTH, angiotensina II, norepinefrina e dopamina também induzem a ativação da fosfolipase C por meio da proteína G, o que ativa a proteína quinase C (PKC). Tanto a PKA como a PKC afetam a Na^+/K^+-ATPase por fosforilação de resíduos de serina em sua subunidade (Fig. 23.5).

Os rins excretam de 0,5 L a mais de 10 L de urina por dia; o volume diário médio é de 1 a 2 L. O volume mínimo necessário para remover os produtos do metabolismo (principalmente nitrogênio excretado sob a forma de ureia) é cerca de 0,5 L/24 h. A osmolalidade do filtrado glomerular é aproximadamente 300 mmol/L e a osmolalidade da urina varia de 80 até 1.200 mmol/L. Portanto, a máxima concentração da urina é de aproximadamente quatro vezes; e, para excretar o excesso de água, ela pode ser diluída a uma osmolalidade menor que a do plasma.

Apenas pequenas quantidades de aminoácidos (0,7 g/24 h) e quase nenhuma glicose estão normalmente presentes na urina. Cada substância reabsorvida nos túbulos renais apresenta seu nível máximo de transporte renal (T_{max}). O T_{max} pode ser ultrapassado quando a quantidade da substância filtrada é maior do que a capacidade máxima de transporte, ou quando as células tubulares não funcionam adequadamente. Assim, a aminoacidúria pode resultar de uma função tubular prejudicada ou do acúmulo de aminoácidos tais como a fenilalanina, leucina, isoleucina e valina no plasma.

O exame de urina pode fornecer várias informações clínicas importantes

A análise da urina (urinálise) em laboratórios clínicos inclui testes para verificar a presença de proteína, glicose, corpos cetônicos, bilirrubina, urobilinogênio e traços de sangue. A determinação da osmolalidade urinária avalia a capacidade renal de concentração. A urina também é analisada quanto à presença de leucócitos e diversos cristais e depósitos (Fig. 23.13). Pesquisas especializadas incluem a análise urinária de aminoácidos, hormônios e outros metabólitos.



Fig. 23.13 Exame de urina (urinálise). É realizado usando-se fitas-teste prontas, fitas revestidas com reagentes fixados sobre um suporte plástico. Ao mergulhar a fita na urina, inicia-se uma reação que fornece um produto colorido. O resultado do teste é obtido pela comparação da cor obtida na fita com uma escala de cor padrão.

O DIABETES FREQUENTEMENTE LEVA A UMA DETERIORAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

Uma mulher de 37 anos de idade com histórico de diabetes do tipo 1 há 12 anos foi a uma consulta de rotina numa clínica de diabetes. Seu controle glicêmico era ruim e o valor de

hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) era 8%. A pressão arterial estava ligeiramente aumentada, com 145/88 mmHg. Uma medida quantitativa da albumina na urina revelou uma concentração de proteína de 5 mg/mmol de creatinina, indicando microalbuminúria. Os valores de referência são:

- **HbA_{1c}:** valor desejável abaixo de 7%
- **Albumina na urina:** inferior a 3,5 mg/mmol de creatinina

Comentário. Esta paciente apresenta uma função renal levemente alterada e pressão arterial elevada em consequência de lesão glomerular provocada pelo diabetes. A presença de microalbuminúria prediz a instalação futura de franca nefropatia diabética. A pressão arterial deve ser mantida menor que 130/80mmHg, de preferência com uma droga inibidora da enzima conversora de angiotensina.

Somente traços de proteína são normalmente detectados na urina, mas esta quantidade aumenta quando ocorre lesão nos glomérulos; a presença de quantidades significativas de proteínas na urina é um sinal importante de doença renal. Mesmo uma quantidade mínima de albumina na urina (microalbuminúria) prediz o desenvolvimento de nefropatia diabética (Cap. 21). Proteínas maiores, tais como as imunoglobulinas, aparecem na urina quando a lesão glomerular é mais extensa: as cadeias leves de imunoglobulinas (proteína de Bence-Jones) aparecem na urina no mieloma múltiplo (Cap. 4). Na anemia hemolítica, a urina pode conter hemoglobina livre e urobilinogênio. A presença de mioglobina na urina é um marcador de lesão muscular (rabdomiólise). A medida da glicose e cetonas na urina é importante para a análise do controle glicêmico em pacientes diabéticos (Cap. 21). As medidas de urobilinogênio e bilirrubina na urina ajudam a avaliar a função hepática (Cap. 29).

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

A taxa de filtração glomerular é a principal característica que descreve a função renal

O *clearance* ou depuração renal é o volume de plasma (em mililitros) que o rim depura de uma dada substância a cada minuto. A taxa de filtração glomerular (TFG) é a principal característica que descreve a função renal. A TFG pode ser estimada pela medida do *clearance* de uma substância, tal como a do polissacarídeo inulina, que não é nem secretado nem reabsorvido nos túbulos renais. A quantidade de inulina filtrada do plasma (isto é, concentração plasmática, P_{in}, multiplicada pela TFG) é igual à quantidade recuperada na urina (isto é, a concentração urinária, U_{in}, multiplicada pela taxa da formação de urina, V).

$$P_{in} \times TFG = U_{in} \times V$$

Dessa fórmula podemos calcular a TFG:

$$TFG = U_{in} \times V / P_{in}$$

A TFG média é 120 mL/min para homens e 100 mL/min para mulheres. O *clearance* renal da inulina é igual à TFG.

As dosagens de ureia e creatinina no soro são os primeiros testes realizados na pesquisa do diagnóstico de doença renal

Administrar intravenosamente inulina sempre que se precisar avaliar a TFG é impraticável. Na prática clínica, se usa determinar o *clearance* da creatinina, um composto derivado da fosfocreatina presente nos músculos esqueléticos. O *clearance* da creatinina é semelhante ao da inulina. Embora alguma creatinina seja reabsorvida nos túbulos renais, isto é compensado por uma secreção tubular equivalente. Para calcular o *clearance* da creatinina, é necessário obter uma amostra de sangue e a urina coletada durante 24 horas. A concentração da creatinina no soro e na urina é medida. A taxa de excreção urinária é calculada dividindo-se o volume urinário total pelo tempo de coleta (V, anteriormente). O *clearance* da creatinina é então calculado segundo a fórmula:

$$\textit{Clearance}\ \text{da creatinina} = \frac{U_{[\text{creatinina}]} \times V}{P_{[\text{creatinina}]}}$$

onde:

P [creatinina] = concentração da creatinina no soro

U[creatinina]= concentração da creatinina na urina

V = taxa de excreção urinária (ml/min).

A taxa de excreção urinária é calculada dividindo-se o volume urinário de 24 horas pelo tempo de coleta em minutos (no caso, 24h = 1.440 minutos).

A concentração de creatinina no soro é de 20-80 mmol/L (0,28-0,90 mg/dL). Um aumento na concentração sérica de creatinina reflete uma diminuição da TFG: a concentração da creatinina sérica dobra quando a TFG diminui aproximadamente 50%. Outro teste usado para avaliar a função

renal é a medida da ureia sérica. No entanto, como a ureia é um produto final do catabolismo proteico, sua quantidade plasmática também é dependente de fatores como a quantidade de proteína ingerida na dieta (Cap. 22) e a taxa de degradação tecidual.

Na prática clínica, as determinações no soro de creatinina e ureia consistem em testes de primeira linha no diagnóstico da insuficiência renal (Fig. 23.14). A insuficiência renal leva a uma redução do volume urinário e do *clearance* da creatinina e aumento na concentração sérica de ureia e creatinina. Recentes avanços em testes laboratoriais incluem a padronização da dosagem de creatinina, criando-se um método, a ser usado em laboratório clínico, semelhante a um método de referência que utiliza espectrometria de massa com um isótopo diluído.

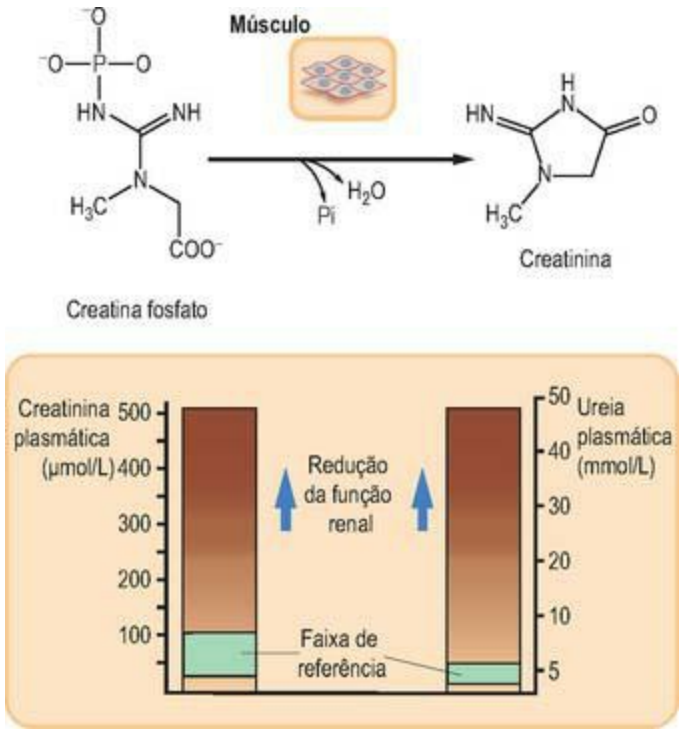


Fig. 23.14 As concentrações de ureia e creatinina no soro são importantes marcadores da função renal. O esquema superior mostra a conversão da fosfocreatina muscular em creatinina. A perda da função de 50% dos néfrons resulta aproximadamente na duplicação da concentração dos níveis séricos de creatinina.

A concentração de cistatina C é outro marcador da taxa de filtração glomerular

A cistatina C é uma proteína de 13 kDa, 122 aminoácidos, que pertence à família dos inibidores de cisteína proteinases. É um produto de gene constitutivo expresso em todas as células nucleadas e é produzido numa taxa constante. Devido a seu pequeno tamanho e seu ponto isoelétrico básico, a cistatina C é filtrada livremente através dos glomérulos. Não é secretada pelos túbulos, e, embora seja reabsorvida, é subsequentemente catabolizada, logo, não retorna para o sangue. Sua concentração é afetada pela idade. Outros fatores, independente da TFG, como a reação inflamatória, podem afetar a concentração de cistatina C.

POTÁSSIO

É fundamental monitorar a concentração de potássio em pessoas com alterações hidroeletrolíticas

TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR ESTIMADA

O *clearance* da creatinina muda com a idade, superfície corporal, sexo e raça. Além disso, a relação entre TFG e concentração de creatinina pode ser diferente entre pessoas sadias e pacientes com doença renal. Atualmente, os cálculos da TFG estão sendo aperfeiçoados incluindo-se na fórmula a concentração de creatinina no soro, assim como os fatores idade, sexo e peso. Não existem evidências, até o momento, que esta TFG estimada identifique melhor o risco de redução da função renal do que as dosagens séricas. Contudo, esta determinação pode ser útil para monitorar a doença renal uma vez que ela já tenha sido diagnosticada.

Os valores de creatinina sérica precisam ser interpretados no contexto do histórico clínico, exame do paciente e resultados de outros testes laboratoriais.

A dosagem da concentração sérica de potássio é muito importante clinicamente (Fig. 23.15). A concentração normal do potássio no soro é 3,5-5 mmol/L. Como a concentração intracelular do potássio é muito maior do que no plasma, alterações relativamente pequenas na concentração de potássio entre o LEC e o LIC podem resultar em alterações importantes em sua concentração no soro. Tanto concentrações baixas quanto altas de potássio (hipocalemia e hipercalemia, respectivamente) podem colocar a vida em risco. Concentrações de potássio inferiores a 2,5 mmol/L ou acima de 6,0 mmol/L são perigosas. O monitoramento da concentração de potássio em pessoas com desordens hidroeletrolíticas é de fundamental importância. A causa mais comum de hipercalemia grave é a insuficiência renal: nesta condição, o potássio não pode ser adequadamente excretado na urina. Por sua vez, a concentração sérica de potássio baixa resulta de perdas excessivas ou na urina ou através do trato gastrointestinal. Os rins contribuem com mais de 90% da perda do potássio corporal. Alterações na concentração do potássio no soro também estão associadas a alterações acidobásicas (Cap. 24).

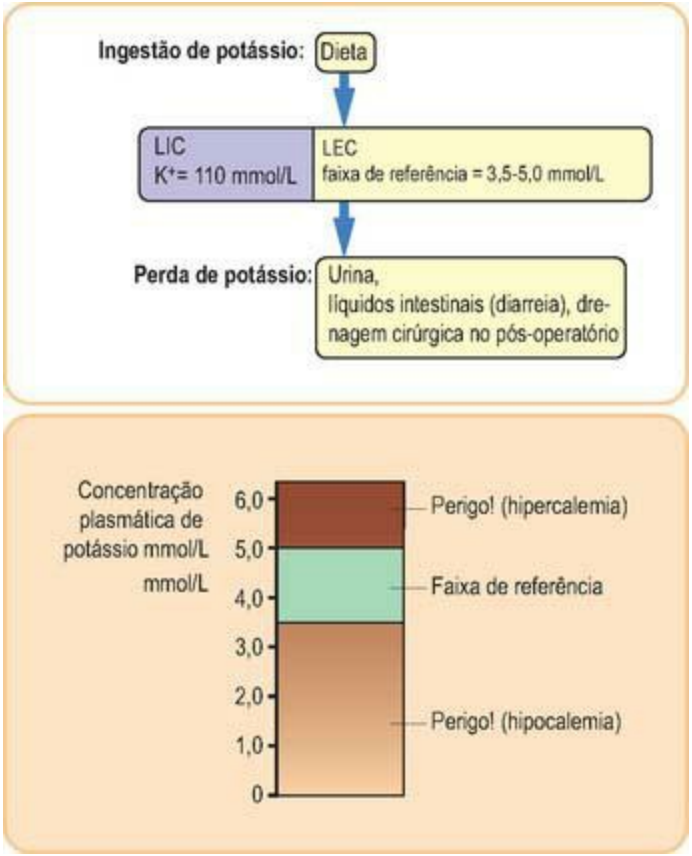


Fig. 23.15 Equilíbrio do potássio. A concentração plasmática do potássio é mantida dentro de limites estreitos. Tanto concentrações baixas (hipocalemia) como elevadas (hipercalemia) podem ser perigosas, porque o potássio afeta a contratilidade do músculo cardíaco. O painel superior mostra as principais vias de perda de potássio.

SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

O sistema renina-angiotensina controla a pressão sanguínea e o tônus vascular

A renina é produzida principalmente no aparelho justaglomerular do rim; é armazenada em grânulos secretores e liberada em resposta a uma redução na pressão de perfusão renal. A renina é uma protease que usa o angiotensinogênio como seu substrato. O angiotensinogênio é uma glicoproteína com mais de 400 aminoácidos, é sintetizado no fígado e seus diferentes derivados apresentam estrutura e peso molecular variáveis. A renina forma a angiotensina pela clivagem do angiotensinogênico. A angiotensina I é um peptídeo com 10 aminoácidos e consiste em um substrato para a peptidil-dipeptidase A (enzima conversora de angiotensina; ECA). A ECA remove dois aminoácidos da angiotensina I, produzindo angiotensina II. Esta reação também pode ser catalisada por enzimas como quimase e catepsina. Outra forma de angiotensina, angiotensina 1-9, é formada pela isoforma da ECA (ECA2) e é subsequentemente degradada a angiotensina 1-7. Esta última também pode ser formada da angiotensina II por endopeptidases. O sistema renina-angiotensina encontra-se ilustrado na Figura 23.16.

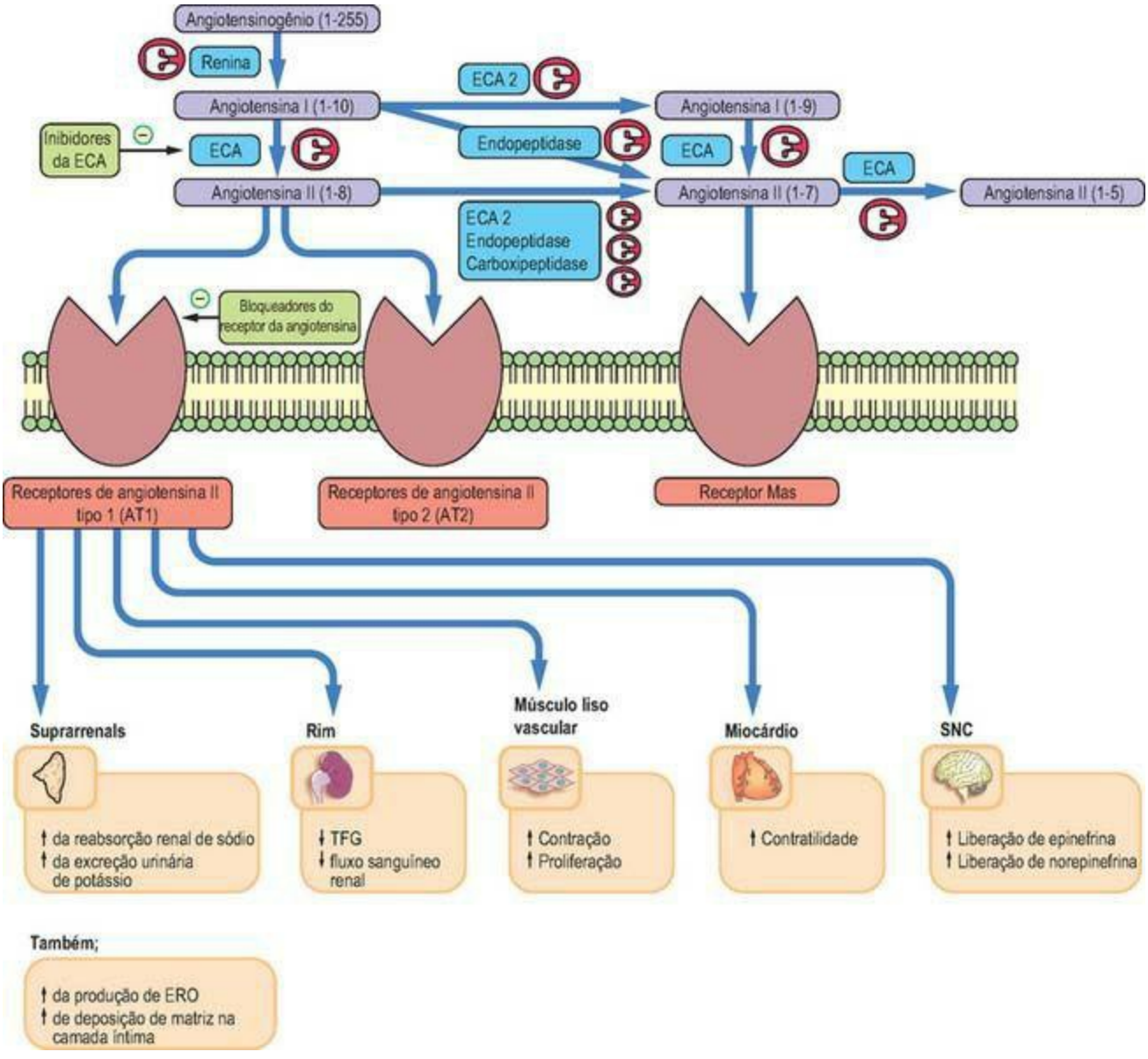


Fig. 23.16 O sistema renina-angiotensina. A renina converte o angiotensinogênio em angiotensina I. A angiotensina I é posteriormente convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Ela também fornece outros peptídeos angiotensina. Ações celulares das angiotensinas são mediadas por receptores tipo 1 (AT1), tipo 2 (AT2) e receptores Mas, que se ligam à angiotensina (1-7). O sistema renina-angiotensina é um alvo para as duas principais classes de drogas anti-hipertensivas: inibidores da ECA (p. ex., ramipril, enalapril) e antagonistas do receptor AT1 (p. ex., losartan). Os inibidores da ECA são também largamente utilizados no tratamento da insuficiência cardíaca. CMLV, células musculares lisas vasculares; SNC, sistema nervoso central. *Receptor AT1 bloqueado pelo losartan. **Receptor AT2 bloqueado pela saralasina. ERO: espécie reativa de oxigênio.

Os receptores de angiotensina são importantes na patogênese da doença cardiovascular

A angiotensina II induz constrição do músculo liso vascular, consequentemente aumentando a pressão sanguínea e reduzindo o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular. Também estimula a liberação de aldosterona e a proliferação das células do músculo liso vascular pela ativação de receptores AT1, os quais sinalizam através de proteínas G e fosfolipase C (Fig. 23.17). Geralmente, a ativação do receptor AT1 tem efeitos que promovem a doença cardiovascular: estimulação da resposta inflamatória, deposição de matriz extracelular, geração de espécies reativas do oxigênio (ERO) e efeito pró-trombótico. Estas ações são antagonizadas pela ativação dos receptores AT2, que induzem vasodilatação por meio da estimulação da produção de óxido nítrico, promovem perda de sódio e inibe a proliferação das células musculares lisas vasculares. As ações da angiotensina (1-7), a qual age por meio do receptor denominado Mas (ela também pode se ligar a AT1 e AT2), também parecem ser cardioprotetoras.

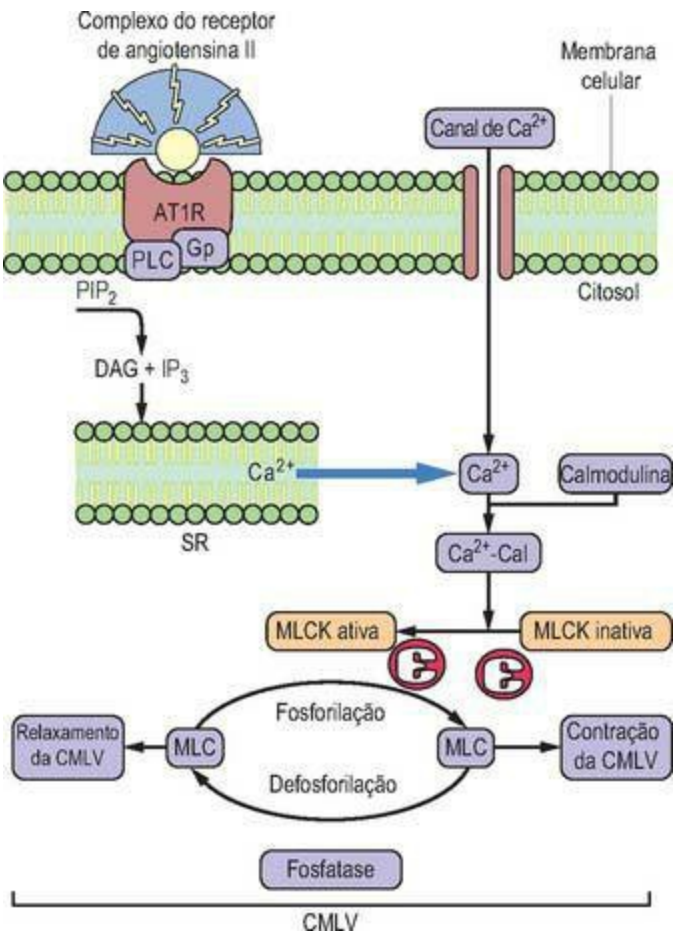


Fig. 23.17 Vasoconstrição induzida pela angiotensina II. O receptor de angiotensina (AT1R) está acoplado a proteínas G. A ligação de angiotensina II com o receptor leva à formação de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e 1,2-diacilglicerol (DAG) mediada pela fosfolipase C. Isto mobiliza Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SR) e estimula a entrada do Ca^{2+} extracelular através da ativação de

canais de cálcio. O aumento do Ca^{2+} citosólico inicia a resposta contrátil das células musculares lisas vasculares. O Ca^{2+} subsequentemente se liga à calmodulina (Cal). O complexo Ca^{2+}-calmodulina ativa a quinase de cadeia leve da miosina (MLKC), que fosforila as cadeias leves da miosina e provoca tensão muscular. Este efeito é terminado pela defosforilação da miosina (Cap. 20). Antagonistas dos receptores AT1, como a losartana, inibem os efeitos vasoconstritores da angiotensina II e são usados no tratamento da hipertensão. AT1R: Receptor de angiotensina AT1; DAG, 1,2, diacilglicerol; CMLU: célula muscular lisa vascular, MLCK: quinase de cadeia leve de miosina; Cal: calmodulina.

Drogas que inibem a ECA são atualmente muito usadas no tratamento da hipertensão e insuficiência cardíaca (Fig. 23.17 e quadro da pág. 66)

Quantidades substanciais de angiotensina II são formadas no rim. As células justaglomerulares contêm ECA, angiotensina I e angiotensina II. A angiotensina II também é sintetizada nas células glomerulares e tubulares e é secretada no líquido tubular e no espaço intersticial. Os receptores da angiotensina II estão presentes nas células tubulares e células vasculares renais: assim, a angiotensina II produzida localmente talvez influencil a reabsorção tubular e o tônus vascular renal pelas ações autócrina e parácrina.

Aldosterona

A aldosterona regula a homeostasia do sódio e do potássio

A aldosterona é o principal hormônio mineralocorticosteroide no homem e é produzida no córtex adrenal. Ela regula o volume extracelular e tônus vascular, e controla o transporte renal de sódio e potássio. A aldosterona se liga ao receptor do mineralocorticoide citosólico nas células epiteliais, principalmente no ducto coletor renal. O receptor se move para o núcleo e se liga a domínios específicos em genes-alvo, alterando a expressão gênica.

A aldosterona regula a Na^+/K^+-ATPase tanto pelo mecanismo de curta quanto pelo de longa duração e também regula transportadores como Na^+/H^+ tipo 3 no túbulo proximal, o cotransportador Na^+/Cl^- no túbulo distal e o canal de sódio na célula epitelial do ducto coletor. O resultado final é um aumento na reabsorção de sódio e secreção aumentada de potássio e íon hidrogênio.

O hiperaldosteronismo é um fator comum na hipertensão

O aldosteronismo primário ocorre como resultado de uma atividade adrenal anormal e é raro. Pode resultar de um tumor adrenal isolado, um adenoma (síndrome de Conn). O hiperaldosteronismo secundário, mais frequente, é devido a uma secreção aumentada de renina. Os feocromocitomas são tumores secretores de catecolaminas que causam hipertensão em cerca de 0,1% dos pacientes hipertensos. É importante diagnosticar corretamente um feocromocitoma porque ele pode ser removido cirurgicamente (Cap. 43 e quadro da pág. 66).

Os peptídeos natriuréticos são marcadores importantes da insuficiência cardíaca

Uma família de peptídeos conhecida como peptídeos natriuréticos está envolvida na regulação do volume de líquidos do corpo. Os dois peptídeos principais são o peptídeo natriurético atrial (ANP) e o peptídeo natriurético cerebral (BNP). O ANP é sintetizado predominantemente no átrio cardíaco como um pró-peptídeo com 126 aminoácidos (pró-ANP). Ele é, então, clivado num pró-peptídeo menor com 98 aminoácidos e no ANP biologicamente ativo com 28 aminoácidos. O BNP é sintetizado nos ventrículos cardíacos como um pró-peptídeo de 108 aminoácidos, e é clivado num pró-peptídeo com 76 aminoácidos e no peptídeo biologicamente ativo BNP com 32 aminoácidos. O BNP 32 e outro peptídeo, CNP (com 23 aminoácidos), foram isolados do cérebro porcino, de onde vem esse nome. Todos os peptídeos natriuréticos possuem uma estrutura em forma de anel devido à presença de uma ponte dissulfeto.

UTILIDADE DIAGNÓSTICA DOS PRÓ-PEPTÍDEOS DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO CEREBRAL (BNP)

Em vez de dosar as formas ativas dos peptídeos natriuréticos no plasma, é mais conveniente determinar os pró-peptídeos presentes no plasma em quantidades equimolares às espécies ativas. O pró-BNP (1-76) alcança níveis mais altos do que o BNP 32 na insuficiência cardíaca. De forma semelhante, o pró-ANP (1-98) possui meia-vida mais longa no plasma do que o ANP 1-28 biologicamente ativo, estando presente, portanto, em concentrações mais altas na circulação.

A INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA LEVA À REDUÇÃO ABRUPTA DO DÉBITO URINÁRIO E CONCENTRAÇÃO AUMENTADA de UREIA E CREATININA NO SORO

Um homem com 25 anos de idade foi admitido no hospital inconsciente após um acidente de motocicleta. Ele apresentava evidências de choque como hipotensão e taquicardia, fratura craniana e diversas lesões nos membros. Apesar do tratamento com coloide intravenoso e sangue ele apresentou oligúria persistente (5-10 mL/hora; oligúria consiste em débito urinário inferior a 20 mL/hora). A oligúria devido à necrose tubular aguda pode ser diferenciada da uremia pré-renal pela medida da osmolalidade urinária (>500 mOsm/kg na uremia pré-renal e <350 mOsm/kg na insuficiência renal aguda), e pela concentração de sódio urinário (<20 mmol/L na azotemia pré-renal e >40 mmol/L na insuficiência renal aguda). No terceiro dia, sua concentração de creatinina sérica tinha subido para 300 μmol/L (3,9 mg/dL) e a concentração da ureia para 21,9 mmol/L (132 mg/dL). Os valores de referência são:

- **creatinina:** 20-80 μmol/L (0,23-0,90 mg/dL)
- **ureia:** 2,5-6,5 mmol/L (16,2-39 mg/dL)

Comentário. Este jovem homem desenvolveu insuficiência renal aguda devido a uma necrose tubular aguda em consequência do choque hipovolêmico. Ele foi submetido à hemodiálise de

emergência. A função renal começou a se recuperar depois de duas semanas com um aumento inicial do débito urinário, a chamada “fase diurética”.

- **ureia** mg/dL = mmol/L × 6,02
- **creatinina** mg/ml = µmol/L x 0,0113

O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA E A INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Um homem de 65 anos de idade, com histórico de infarto do miocárdio, apresentou-se com fadiga crescente, dificuldade de respirar e edema de tornozelos. O exame físico revelou taquicardia leve e aumento da pressão venosa jugular. O ecocardiograma mostrou que a função do ventrículo esquerdo durante a sístole estava prejudicada. As dosagens séricas do paciente revelaram: sódio 140 mmol/L, potássio 3,5 mmol/L, proteínas 34 g/dL (normal 35-45 g/dL), creatinina 80 µmol/L (0,90 mg/dL) e ureia 7,5 mmol/L (45 mg/dL).

Comentário. Este homem se apresenta com sintomas e sinais de insuficiência cardíaca. A função cardíaca prejudicada leva a uma redução do fluxo sanguíneo pelos rins, ativação do sistema renina-angiotensina e estímulo da secreção de aldosterona. A aldosterona causa um aumento na reabsorção renal de sódio e retenção de água, aumentando assim o volume de líquido extracelular e causando edema.

Os peptídeos natriuréticos promovem excreção renal de sódio e redução da pressão sanguínea. O ANP e o BNP são secretados em resposta à distensão atrial e à sobrecarga de volume no ventrículo. Eles se ligam a receptores ligados a proteínas G: os receptores tipo A estão localizados predominantemente nas células endoteliais e os receptores tipo B, no cérebro. Existe uma reatividade cruzada entre os diferentes receptores natriuréticos em relação a estes peptídeos. É importante notar que os níveis de ANP e de BNP estão aumentados na insuficiência cardíaca e consequentemente suas medidas são usadas como marcadores bioquímicos precoces desta condição. Estas medidas são particularmente úteis para excluir a presença de insuficiência cardíaca nos pacientes que se apresentam com sintomas inespecíficos tais como dificuldade respiratória.

Vasopressina e aquaporinas

A reabsorção de água nos ductos coletores renais é controlada pelo hormônio vasopressina, da pituitária posterior, que controla a atividade dos canais de água na membrana, aquaporinas.

A vasopressina determina o volume final e a concentração da urina

A vasopressina (também conhecida como hormônio antidiurético, ADH) controla a reabsorção de água nos ductos coletores renais (Fig. 23.18). A vasopressina é sintetizada nos núcleos supraóticos e paraventricular do hipotálamo e é transportada ao longo dos axônios para a pituitária posterior, onde é armazenada antes de ser processada e liberada. A vasopressina se liga ao seu receptor localizado nas membranas das células tubulares nos ductos coletores. O receptor é acoplado a proteínas G e ativa a proteína quinase A (PKA). A PKA fosforila a aquaporina 2 (AQP2), o que estimula sua translocação para a membrana celular, aumentando a reabsorção de água no ducto coletor. A secreção de vasopressina precisa ser inibida para permitir a formação de urina diluída. A impossibilidade de inibição total da vasopressina resulta em incapacidade de diluir a urina em níveis de osmolalidade menores do que a do plasma.

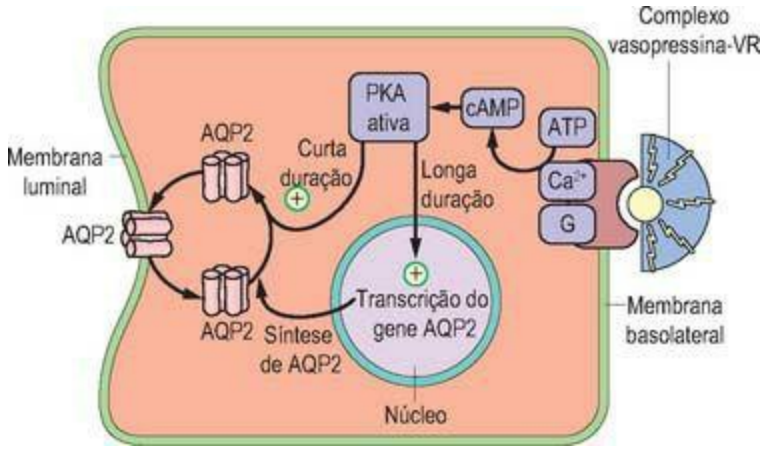


Fig. 23.18 A vasopressina regula a reabsorção de água no ducto coletor. A vasopressina controla o canal de água aquaporina 2 (AQP2). A vasopressina se liga a seu receptor (VR) e, por meio da ativação de proteínas G (G), estimula a produção de cAMP que ativa a proteína quinase A (PKA). A PKA fosforila o AQP2 citoplasmático, e induz sua translocação para a membrana celular, aumentando a capacidade de transporte de água. A vasopressina também regula a expressão do gene AQP2. AC, adenilato ciclase.

Outros hormônios afetam a secreção de vasopressina. Os glicocorticoides estimulam, sobretudo por meio de seus efeitos hemodinâmicos que diminuem a pressão arterial. Incidentalmente, a AVP também é estimulada pela nicotina.

Aquaporinas são proteínas que formam canais na membrana que transportam água

O canal de água aquaporina está ilustrado na Figura 23.19. A aquaporina 1 (AQP1) encontra-se expressa nas membranas apicais e basolaterais do túbulo proximal e no ramo descendente da alça de Henle e não é regulada pela vasopressina. Encontra-se presente também em eritrócitos, células tubulares renais proximais e no endotélio capilar. As AQP2 e 3 estão presentes nos ductos coletores renais e são reguladas pela vasopressina.

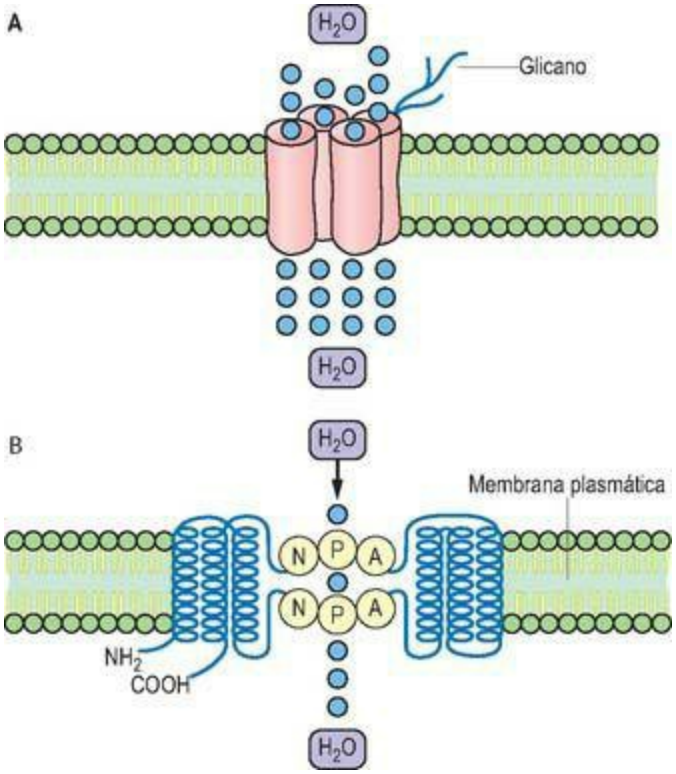


Fig. 23.19 Canal de água aquaporina. A aquaporina 1 é um canal de água formado por várias subunidades com uma unidade glicana ligada a uma de suas subunidades (A). Cada um dos monômeros apresenta duas estruturas de repetição ao acaso, consistindo em três regiões transmembrana (B) e alças de ligação imersas na membrana.

Defeitos na secreção de vasopressina e mutações nos genes que codificam as aquaporinas causam alterações clínicas

A deficiência de vasopressina causa uma condição conhecida como diabetes insipidus, na qual grande quantidade de urina diluída é perdida. Por sua vez, a secreção excessiva de vasopressina pode ocorrer após um grande trauma ou cirurgia. Esta condição é conhecida como síndrome da secreção inapropriada de hormônio antidiurético (SIADH), e leva a retenção de água.

Mutações no gene do receptor da vasopressina e também no gene da AQP2 levam a diferentes tipos da chamada diabetes insípida nefrogênica, uma condição associada à perda de grande quantidade de urina e desidratação. A Figura 23.20 resume a regulação da água pelo rim.

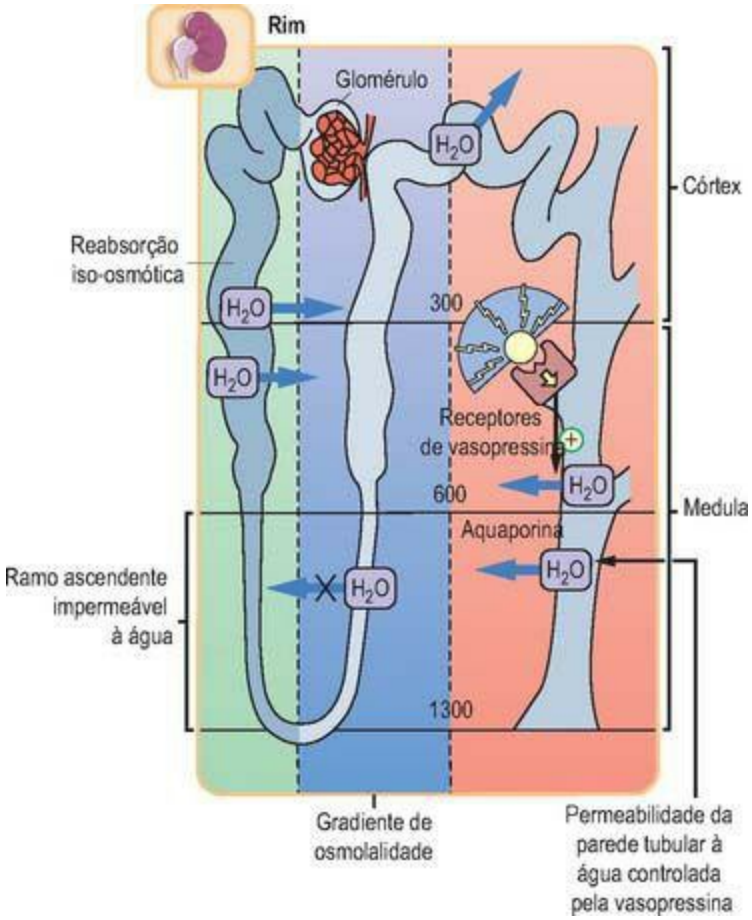


Fig. 23.20 Reabsorção e excreção renal de água. A permeabilidade das paredes dos túbulos à água difere ao longo do néfron. Cerca de 80% da água filtrada é reabsorvida no túbulo proximal por reabsorção iso-osmótica. O ramo ascendente da alça de Henle é impermeável à água. No ducto coletor, a vasopressina controla a reabsorção de água através dos canais de água aquaporina.

INTEGRAÇÃO DA HOMEOSTASE DA ÁGUA E DO SÓDIO

Aldosterona e vasopressina juntas controlam o uso da água e do sódio

Normalmente, apesar das variações na ingestão de líquido, a osmolalidade do plasma é mantida dentro de limites estreitos (280-295 mmol/kg H_2O). A vasopressina contribui para o controle da osmolalidade plasmática regulando o metabolismo da água. Ela responde tanto aos sinais osmóticos como de volume. Por um lado, sua secreção e a sede são estimuladas por sinais dos osmorreceptores que respondem a aumentos bem pequenos (cerca de 1%) na osmolalidade plasmática. Por outro lado, a liberação da vasopressina é estimulada por uma redução (acima de 10%) no volume circulante.

Água em excesso aumenta o volume do plasma, do fluxo sanguíneo renal e da TFG

Na condição de excesso de água, a produção de renina é suprimida. A baixa concentração de aldosterona permite a perda de sódio na urina. Como o excesso de água dilui o plasma, a osmolalidade plasmática diminui. A redução na osmolalidade, detectada pelos osmorreceptores hipotalâmicos, suprime a sede e a secreção de vasopressina. A supressão da vasopressina leva a perda de água pela urina. A resposta global ao excesso de água é a excreção aumentada de água e sódio.

OS DIURÉTICOS SÃO USADOS PARA O TRATAMENTO DE EDEMA, INSUFICIÊNCIA CARDÍACA E HIPERTENSÃO

Os diuréticos são drogas que estimulam a excreção de água e sódio. Os diuréticos tiazídicos, por exemplo, bendrofluazida, reduzem a reabsorção de sódio nos túbulos distais bloqueando o cotransporte de sódio e cloreto. Os diuréticos de alça, tais como a furosemida, inibem a reabsorção de sódio na porção ascendente da alça de Henle. A espironolactona, um diurético poupador de potássio, é um inibidor competitivo da aldosterona: inibe a troca sódio-potássio nos túbulos distais e diminui a excreção de potássio.

Uma diurese osmótica pode ser induzida pela administração de um açúcar álcool, o manitol. O efeito líquido do tratamento com diuréticos é o volume urinário aumentado e perda de água e sódio. Os diuréticos são importantes no tratamento do edema associado a problemas circulatórios, tais como insuficiência cardíaca, nos quais a função cardíaca deficiente leva à falta de ar grave causada por edema pulmonar. Eles também são essenciais no tratamento da hipertensão.

INGESTÃO DEFICIENTE DE LÍQUIDOS LEVA À DESIDRATAÇÃO

Um homem de 80 anos de idade foi admitido no hospital após ter permanecido por período prolongado no chão de sua casa, como resultado de um derrame agudo. Ele apresentou turgor tecidual deficiente, secura na boca, taquicardia e hipotensão. Dosagens no soro revelaram: sódio 150 mmol/L, potássio 5,2 mmol/L, bicarbonato 35 mmol/L, creatinina 110 µmol/L (1,13 mg/dL) e ureia 19 mmol/L (90,3 mg/dL).

Os valores de referência são:

Sódio: 135-145 mmol/L

Potássio: 3,5-5,0 mmol/L

Bicarbonato: 20-25 mmol/L

Creatinina: 20-80 µmol/L (0,28-0,90 mg/dL)

Ureia: 2,5-6,5 mmol/L (16,2-39 mg/dL)

Comentário. Este paciente se apresenta com desidratação, indicada pelos altos valores de sódio e ureia. Ele foi tratado com fluido intravenoso predominantemente na forma de glicose 5% para repor o déficit de água.

O déficit de água (desidratação) leva à redução no volume plasmático, no fluxo de sangue renal e na TFG

Quando existe desidratação, a redução no fluxo sanguíneo renal estimula o sistema renina-angiotensina-aldosterona. A aldosterona inibe a excreção urinária de sódio. Além disso, devido à perda de água, a osmolalidade plasmática aumenta e estimula a secreção de vasopressina, com consequente redução no volume urinário. Desta maneira, a resposta ao déficit de água é a retenção de sódio e água (Fig. 23.21).

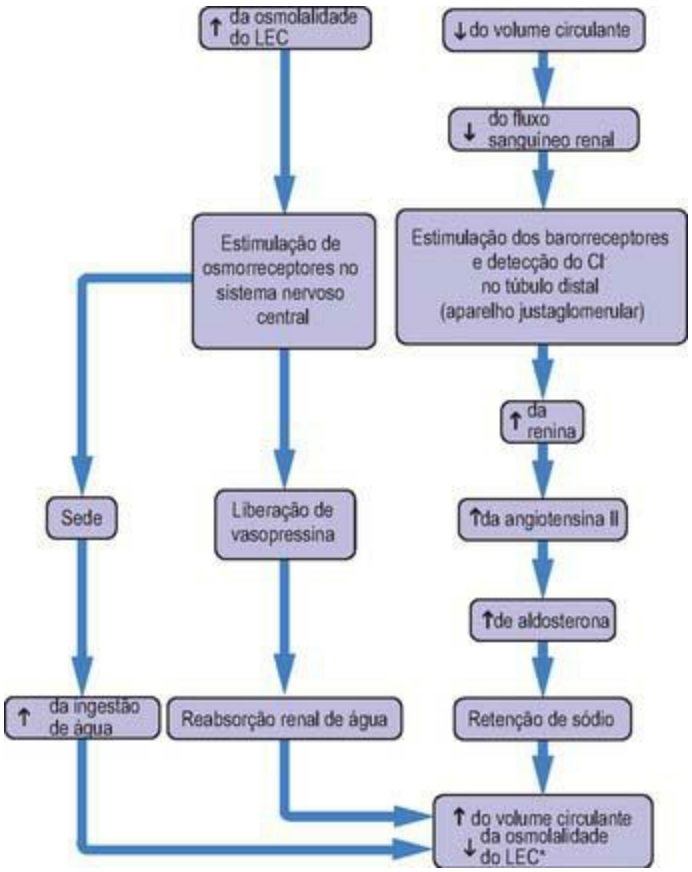


Fig. 23.21 Inter-relação entre o metabolismo da água e do sódio. Os metabolismos da água e do sódio estão intimamente ligados. Um aumento na osmolalidade do LEC estimula a secreção da vasopressina, levando ao aumento da reabsorção renal da água. Isto "dilui" o LEC e a osmolalidade diminui. Esta resposta é reforçada pelo estímulo da sede. Um decréscimo no volume plasmático também estimula a retenção de água por meio da estimulação de receptores sensíveis à pressão (barorreceptores) no aparelho justaglomerular. *A osmolalidade vai diminuir se o grau de retenção de água for relativamente maior do que a retenção de sódio.

A concentração de sódio no soro é um marcador de desordens do equilíbrio hidroeletrolítico

Os distúrbios hidroeletrolíticos resultam de um desequilíbrio entre a ingestão de líquidos e eletrólitos e sua eliminação, e do movimento da água e eletrólitos entre os compartimentos do organismo. Uma redução na concentração de sódio (hiponatremia) geralmente indica que o líquido extracelular está sendo "diluído" (presença de excesso de água), enquanto uma concentração de sódio aumentada significa que o líquido extracelular está sendo "concentrado" (água está sendo perdida). A hiponatremia também pode resultar da perda de sódio, mas é raro.

A avaliação da condição hídrica e eletrolítica do paciente é uma etapa importante na prática clínica

A avaliação do equilíbrio hidroeletrolítico é uma parte importante do exame clínico. Além do exame físico e da história médica, as seguintes dosagens são necessárias:



A HIPERTENSÃO ARTERIAL É UMA DOENÇA COMUM

A hipertensão consiste num aumento inadequado da pressão sanguínea arterial. É desejável que os níveis das pressões sanguíneas sistólica e diastólica sejam menores que 140 mmHg e 90 mmHg, respectivamente (valores ótimos são ainda menores, abaixo de 120/80 mmHg). Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 20% da população do mundo desenvolvido sofre desta condição. A hipertensão arterial pode ser classificada como "essencial" (primária) ou "secundária". A causa da hipertensão essencial ainda não foi identificada, embora se saiba que envolve diversos fatores genéticos e ambientais, incluindo componentes neurais, endócrinos e metabólicos. Uma dieta rica em sódio é um fator reconhecido no desenvolvimento da hipertensão.

A hipertensão está associada a um risco aumentado de derrame e infarto do miocárdio e é responsável por uma em cada oito mortes no mundo inteiro. Uma variedade de drogas é empregada no tratamento moderno da hipertensão. Entre estas se incluem diuréticos tais como a bendrofluazida, drogas que bloqueiam os adrenorreceptores, inibidores da enzima conversora da angiotensina e antagonistas dos receptores AT1 de angiotensina (quadro da pág. 323 e quadro da pág. 66; o feocromocitoma é descrito na pág. 588).

- concentrações séricas dos eletrólitos: o perfil solicitado rotineiramente compreende sódio, potássio, cloreto e bicarbonato
- concentrações séricas de creatinina e ureia
- volume, osmolalidade e concentração de sódio na urina
- osmolalidade sérica

Os pacientes que possuem ou correm risco de desenvolver alterações hidroeletrolíticas necessitam de acompanhamento diário da ingestão e perda de líquidos (mapa de fluidos).

Resumo

■Tanto o déficit de água no organismo (desidratação) como o excesso (super-hidratação) causam problemas clínicos potencialmente graves. Portanto, a avaliação do equilíbrio hidroeletrolítico é uma parte importante do exame clínico.

■O equilíbrio da água corporal está intimamente ligado com o equilíbrio dos íons dissolvidos (eletrólitos), dentre os quais, os mais importantes são o sódio e o potássio.

■O movimento da água entre o LEC e o LIC é controlado pelo gradiente osmótico.

■O movimento da água entre a luz de um vaso sanguíneo e o líquido intersticial é controlado pelo equilíbrio entre as pressões osmótica e hidrostática.

■Os principais reguladores do equilíbrio hidroeletrolítico são a vasopressina (água) e a aldosterona (sódio e potássio).

■O sistema renina-angiotensina é o principal regulador da pressão sanguínea e do tônus vascular.

■A dosagem dos peptídeos natriuréticos ajuda no diagnóstico da insuficiência cardíaca.

■As concentrações séricas de ureia e creatinina são os principais testes realizados para avaliação da função renal.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Comente sobre o papel da bomba de Na^+/K^+-ATPase na manutenção dos gradientes iônicos através da membrana celular.

2. Explique o papel do sistema renina-angiotensina na manutenção da pressão do sangue.

3. Descreva o movimento da água entre o LEC e o LIC que ocorre na privação de água.

4. Por que uma baixa concentração de albumina no plasma leva ao edema?

Leituras sugeridas

Androgue HJ, Madias NE. Mechanisms of disease: sodium and potassium in the pathogenesis of hypertension. *N Engl J Med*. 2007;356:1966-1978.

Bekheirnia R, Schrier RW. Pathophysiology of water and sodium retention: edematous states with normal kidney function. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6:202-207.

Chobanian A, Bakris GL, Black HR, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. *JAMA*. 2003;289:2560-2572.

Li J, Gobe G. Protein kinase C activation and its role in kidney disease. *Nephrology*. 2006;11:428-434.

Moro C, Berlan M. Cardiovascular and metabolic effects of natriuretic peptides. *Fund Clin Pharmacol*. 2006;20:41-49.

Schrier RW. Body water homeostasis: clinical disorders of urinary dilution and concentration. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:1820-1832.

Regulação da Concentração do Íon Hidrogênio (Equilíbrio Acidobásico)

M.H. Dominiczak, M. Szczepanska-Konkel

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Explicar a origem do tampão bicarbonato.
- Descrever a troca gasosa que ocorre nos pulmões.
- Descrever os componentes respiratório e metabólico do equilíbrio acidobásico.
- Definir e classificar acidose e alcalose.
- Comentar sobre as condições clínicas associadas aos distúrbios do equilíbrio acidobásico.

O metabolismo gera dióxido de carbono. O dióxido de carbono gerado nos tecidos se dissolve em H_2O formando ácido carbônico, que se dissocia liberando o íon hidrogênio. Além disso, o metabolismo gera ácidos fortes, tais como o ácido sulfúrico, e ácidos orgânicos, tais como os ácidos úrico, lático e outros; todos são fontes de íon hidrogênio no líquido extracelular. Apesar disto, a concentração sanguínea do íon hidrogênio (ou seu logaritmo negativo, o pH) é surpreendentemente constante: permanece entre 36 e 46 nmol/L (pH 7,36-7,46). As mudanças no pH afetam a ionização de proteínas (Cap. 2) e, consequentemente, a atividade de muitas enzimas. De forma relevante, mudanças no pH, juntamente com a pressão parcial do dióxido de carbono (pCO_2), mudam a forma da curva de saturação de hemoglobina, afetando a oxigenação do tecido (Cap. 5). Um decréscimo no pH aumenta o tônus simpático e pode causar disritmias cardíacas.

A manutenção do equilíbrio acidobásico envolve pulmões, eritrócitos e rins

A manutenção do equilíbrio acidobásico envolve os pulmões, os eritrócitos e os rins (Fig. 24.1). Os pulmões controlam a troca do dióxido de carbono e oxigênio entre o sangue e a atmosfera externa; os eritrócitos transportam os gases entre os pulmões e os tecidos; e os rins controlam a síntese do bicarbonato plasmático e a excreção do íon hidrogênio.

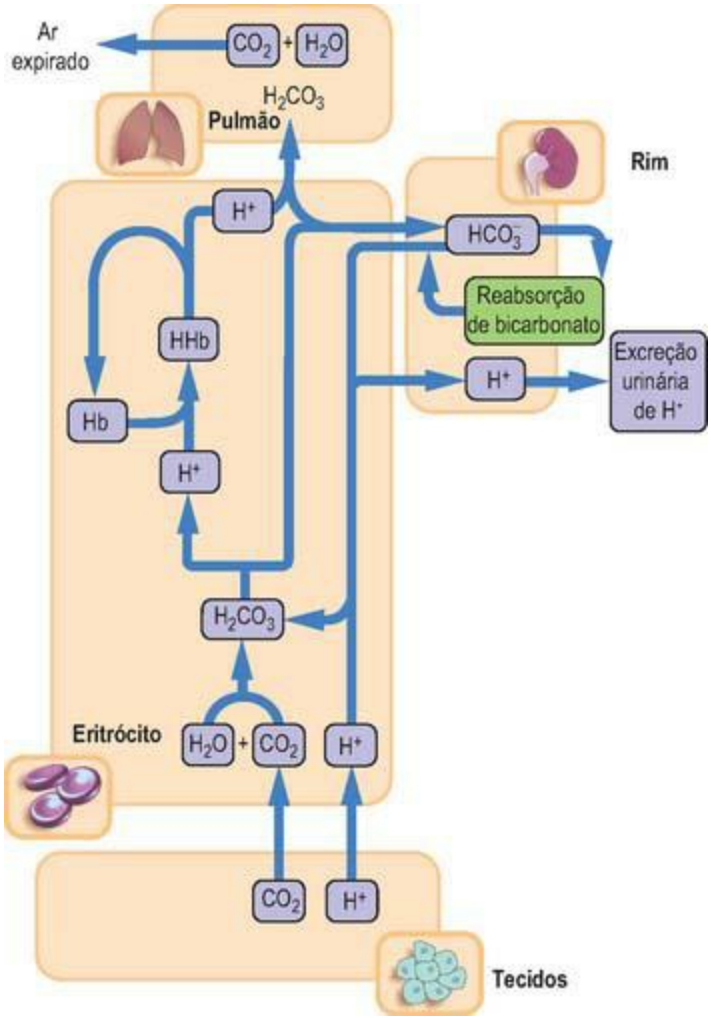


Fig. 24.1 Equilíbrio acidobásico. Os pulmões, rins e eritrócitos contribuem para a manutenção do equilíbrio acidobásico. Os pulmões controlam a troca gasosa com o ar atmosférico. O dióxido de carbono gerado nos tecidos é transportado no plasma como bicarbonato; a hemoglobina no eritrócito (Hb) também contribui com o transporte de CO_2. A hemoglobina tampona o íon hidrogênio derivado do ácido carbônico. Os rins reabsorvem o bicarbonato filtrado nos túbulos proximais e geram novo bicarbonato nos túbulos distais, onde ocorre uma secreção líquida de íon hidrogênio.

Clinicamente, o entendimento do equilíbrio acidobásico é importante em muitas subespecialidades da medicina e cirurgia e, particularmente, nos cuidados médicos críticos.

OS SISTEMAS TAMPÕES CORPORAIS

A produção metabólica de CO_2, o metabolismo de aminoácidos que contém enxofre e de compostos contendo fósforo geram quantidades substanciais de ácidos inorgânicos e orgânicos. O metabolismo também gera ácido lático e cetoácidos (acetoacetato e β-hidroxibutirato). O excesso de ácido lático é a principal característica da condição de hipóxia e o excesso de cetoácidos é importante no diabetes (Cap. 21). Ácidos derivados de outras fontes além do CO_2 são conhecidos como não voláteis; por definição, não podem ser eliminados pelos pulmões, devendo ser excretados pelos rins. A produção líquida de ácidos não voláteis é da ordem de 50 mmol/24 h.

O sangue e os tecidos contêm sistemas tampões que minimizam as mudanças na concentração de íons hidrogênio

O principal tampão que neutraliza os íons hidrogênio liberados das células é o tampão bicarbonato. A hemoglobina tampona o hidrogênio gerado pela reação da anidrase carbônica (ver a seguir). O íon hidrogênio é neutralizado por tampões intracelulares, principalmente proteínas e fosfatos (Tabela 24.1 e Cap. 2).

Tabela 24.1 Principais tampões no corpo humano. Princípios da ação de tampões (Cap. 2).

Tampão	Ácido	Base conjugada	Principal ação tamponante
Hemoglobina	HHb	Hb^-	eritrócitos
Proteínas	HProt	$Prot^-$	intracelular
Tampão fosfato	$H_2PO_4^-$	HPO_4^{2-}	intracelular
Bicarbonato	$CO_2 \rightarrow H_2CO_3$	HCO_3^-	extracelular

O tampão bicarbonato

O tampão bicarbonato permanece em equilíbrio com o ar atmosférico, criando um sistema aberto cuja capacidade é superior a de todos os sistemas tampões "fechados". O dióxido de carbono produzido metabolicamente se difunde através das membranas celulares e se dissolve no plasma. O coeficiente de solubilidade do CO_2 no plasma é de 0,23 se a pCO_2 for medida em kPa (0,03 se a pCO_2 for medida em mmHg; 1 kPa = 7,5 mmHg ou 1 mmHg = 0,133 kPa). Portanto, com a pCO_2 normal de 5,3 kPa (40 mmHg), a concentração de CO_2 dissolvido (dCO_2) é:

$$dCO_2 \text{ (mmol/L)} = 5{,}3 \text{ kPa} \times 0{,}23 = 1{,}2 \text{ mmol/L}$$

Este CO_2 se equilibra com H_2CO_3 no plasma por meio de uma reação não enzimática e muito lenta. Normalmente, a concentração de H_2CO_3 no plasma é muito baixa, cerca de 0,0017 mmol/L. Contudo, devido ao equilíbrio entre H_2CO_3 e CO_2 dissolvido no plasma (teoricamente, todo CO_2 dissolvido pode por fim se converter em H_2CO_3), este componente do tampão bicarbonato é igual à soma do H_2CO_3 e CO_2 dissolvido (na prática, é igual ao CO_2 dissolvido).

A equação-padrão que descreve o comportamento do tampão bicarbonato é a equação de Henderson-Hasselbach (Cap. 2). Ela expressa a relação entre o pH e os componentes do tampão:

$$pH = pK + \log [\text{bicarbonato}]/pCO_2 \times 0{,}23$$



OS COMPONENTES RESPIRATÓRIOS E METABÓLICOS DO EQUILÍBRIO ACIDOBÁSICO JUNTOS MANTÊM ESTÁVEL A CONCENTRAÇÃO DO ÍON HIDROGÊNIO

Os pulmões e os rins contribuem para a manutenção do pH sanguíneo. Eles são chamados componentes respiratórios e metabólicos do equilíbrio acidobásico, respectivamente. Os dois componentes estão intimamente ligados. Quando o distúrbio primário é respiratório e causa acúmulo de CO_2, ocorre um aumento compensatório na reabsorção renal de bicarbonato. Pelo contrário, uma redução na pCO_2 reduz a reabsorção de bicarbonato. Quando o distúrbio primário é metabólico, uma redução na concentração do bicarbonato (e a consequente redução do pH) estimula o centro respiratório a aumentar a taxa de ventilação. O CO_2 é expirado e a pCO_2 plasmática é reduzida. Este é o motivo pelo qual os pacientes com acidose metabólica hiperventilam. Por sua vez, um aumento no bicarbonato plasmático (levando a um aumento do pH) leva à redução da taxa de ventilação e retenção de CO_2. *As mudanças compensatórias sempre ajudam a retornar o pH ao normal.*

Esta equação demonstra que o pH plasmático é determinado pela proporção entre as concentrações de bicarbonato plasmático (o componente "base" do tampão) e o CO_2 dissolvido (o componente "ácido"). Normalmente, numa pCO_2 plasmática de 5,3 kPa (concentração de dCO_2 de 1,2 mmol/L), a concentração plasmática de bicarbonato é cerca de 24 mmol/L. O pK do tampão

bicarbonato é 6,1. Vamos inserir as concentrações dos componentes do tampão na equação de Henderson-Hasselbach:

$$pH = 6,1 + \log(24/1,2) = 7,40$$

Dessa maneira, o pH de 7,40 (concentração do íon hidrogênio de 40 nmol/L) é o pH do líquido extracelular correspondendo a uma concentração normal de bicarbonato e uma pressão parcial de CO_2 normal.

O tampão bicarbonato minimiza as alterações na concentração do íon hidrogênio quando acrescentamos ácidos ou bases ao sangue. Quando acrescentamos um ácido (H^+), ele reage com o bicarbonato; isto forma ácido carbônico, que sofre dissociação liberando CO_2. A pCO_2 do sangue aumenta levemente e o CO_2é eliminado através dos pulmões. O excesso de íon hidrogênio foi neutralizado.

$$H^+ + HCO_3^- \leftrightharpoons H_2CO_3 \leftrightharpoons CO_2 + H_2O$$

Quando acrescentamos uma base (OH^-), ela reage com o ácido carbônico, fornecendo água. A concentração de bicarbonato aumenta levemente

$$OH^- + H_2CO_3 \leftrightharpoons H_2O + HCO_3^-$$

como uma consequência da redução na concentração de H_2CO_3; reação

$$CO_2 + H_2O \leftrightharpoons H_2CO_3$$

prossegue para a direita, aumentando o H_2CO_3. O excesso de OH^- foi neutralizado. A depleção de CO_2 é depois compensada pela redução da taxa de ventilação.

As explicações anteriores ilustram que o denominador da equação de Henderson-Hasselbach (pCO_2) é controlado pelos pulmões. Por este motivo, é chamado “componente respiratório do equilíbrio acidobásico”. Por sua vez, a concentração plasmática de bicarbonato é controlada pelos rins e eritrócitos e é chamada “componente metabólico do equilíbrio acidobásico”.

Os eritrócitos e as células tubulares renais contêm uma enzima que contém zinco, a anidrase carbônica (AC), que converte o CO_2 dissolvido em ácido carbônico. O ácido carbônico se dissocia, produzindo íons hidrogênio e bicarbonato:x2

$$CO_2 + H_2O \leftrightharpoons H_2CO_3 \leftrightharpoons HCO_3^- + H^+$$

Essa é a forma como as células tubulares renais e os eritrócitos produzem bicarbonato. Os rins regulam a reabsorção e a síntese de bicarbonato e os eritrócitos ajustam sua concentração plasmática em resposta a mudanças na pCO_2.

Tamponamento intracelular

Os tampões intracelulares são representados pelas proteínas e fosfatos

O íon hidrogênio penetra nas células em troca de potássio (isto pode resultar num aumento da concentração plasmática de potássio). Ao contrário, redução na concentração do íon hidrogênio no plasma, ou um excesso de bicarbonato, seria tamponado por íon hidrogênio derivado das células. Neste caso, o íon hidrogênio entraria no plasma em troca de potássio, reduzindo a concentração plasmática de potássio.

Portanto, a acidemia (pH plasmático baixo) pode estar associada a hipercalemia e alcalemia (pH sanguíneo elevado) com hipocalemia (Fig. 24.2).

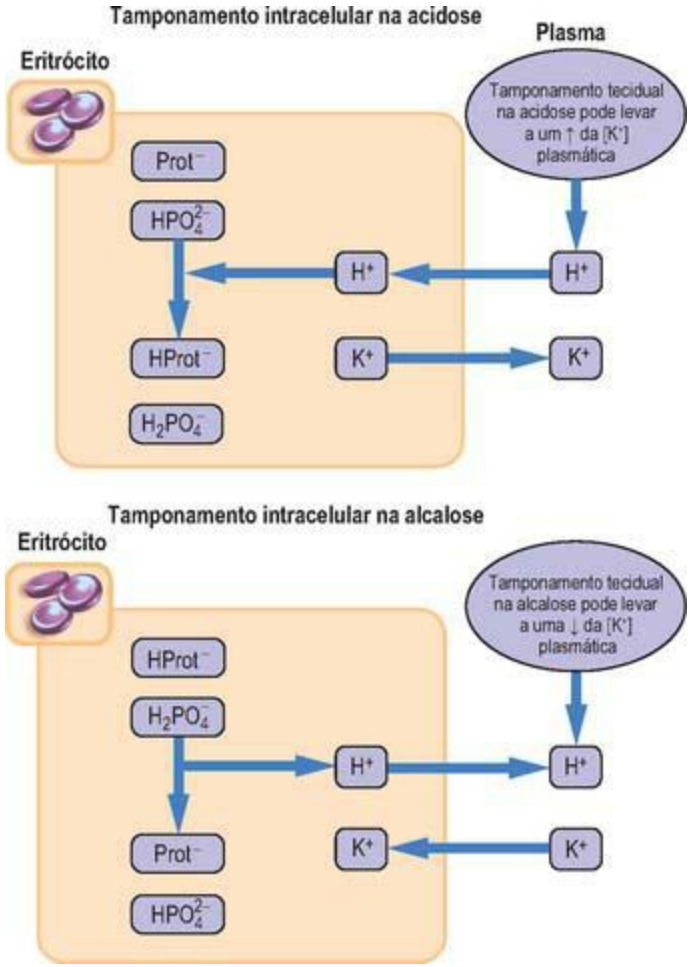


Fig. 24.2 Tampões intracelulares: proteínas, fosfatos e troca de potássio. Os tampões intracelulares são principalmente proteínas e fosfatos. O íon hidrogênio do plasma penetra nas células em troca de potássio. Portanto, um acúmulo de íon hidrogênio no plasma (acidemia) e a consequente entrada do íon hidrogênio nas células leva a um aumento da concentração plasmática de potássio. Por sua vez, um déficit do íon hidrogênio no plasma (alcalemia) pode levar a uma baixa concentração de potássio plasmático. Prot, proteína.

Classificação dos distúrbios acidobásicos

O conceito de componente respiratório e metabólico do equilíbrio acidobásico é a base para a classificação dos distúrbios do equilíbrio acidobásico (Fig. 24.3). Eles são divididos em acidose ou alcalose. A acidose é um processo que leva ao acúmulo de íon hidrogênio. A alcalose leva a uma redução na concentração do íon hidrogênio (acidemia e alcalemia são termos que descrevem apenas o pH sanguíneo; portanto, acidose e alcalose resultam em acidemia e alcalemia, respectivamente).

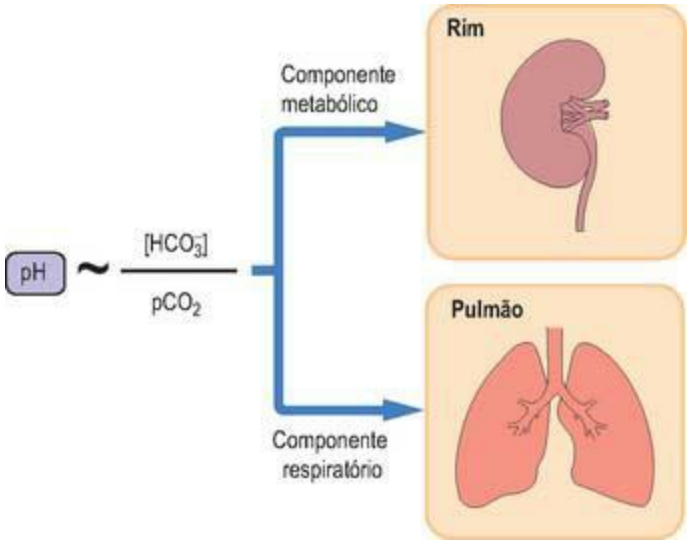


Fig. 24.3 Componentes do tampão bicarbonato. O pH sanguíneo é proporcional à razão entre o bicarbonato plasmático e a pressão parcial de dióxido de carbono no sangue (pCO_2). Os componentes do tampão bicarbonato são o dióxido de carbono e o bicarbonato. A pCO_2 é chamada de "componente respiratório do equilíbrio acidobásico" porque depende da frequência respiratória e o bicarbonato é o "componente metabólico".

Dependendo da causa primária, a acidose ou a alcalose pode ser respiratória ou metabólica. Assim, existem quatro distúrbios principais do equilíbrio acidobásico: acidose respiratória, acidose metabólica, alcalose respiratória e alcalose metabólica (Fig. 24.4). No entanto, distúrbios mistos também podem se desenvolver; estes serão tratados posteriormente neste capítulo.

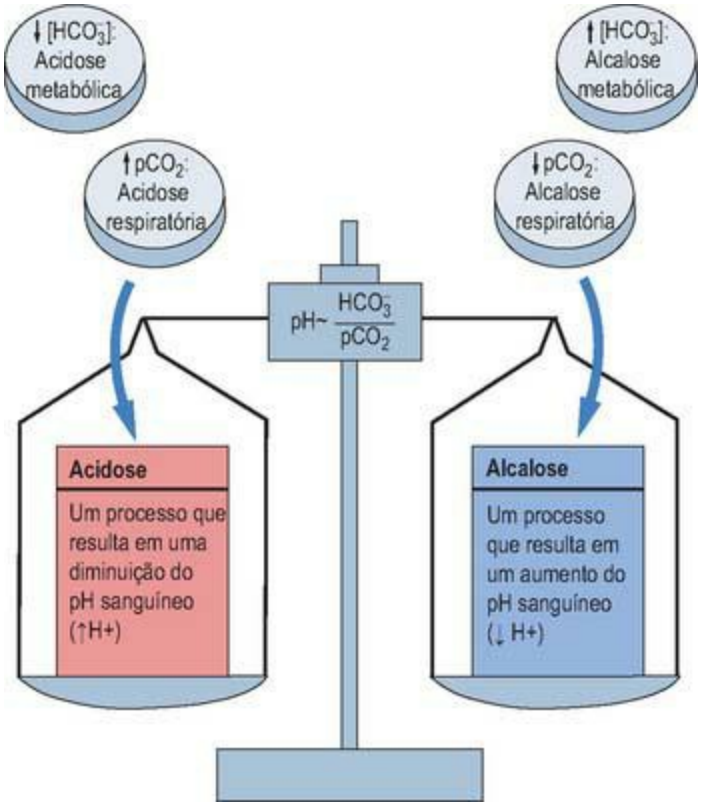


Fig. 24.4 Distúrbios do equilíbrio acidobásico. Um aumento primário na pCO_2 ou uma redução na concentração de bicarbonato plasmático leva à acidose. Uma redução de pCO_2 ou um aumento no bicarbonato plasmático leva à alcalose. Se a alteração primária ocorrer na pCO_2, o distúrbio é chamado de respiratório; e se a alteração primária ocorrer no bicarbonato plasmático, é chamada de metabólica.

PULMÕES: A TROCA GASOSA

Os pulmões fornecem o oxigênio necessário para o metabolismo tecidual e removem o CO2 produzido pelo metabolismo

Aproximadamente 10.000 L de ar atravessam os pulmões de uma pessoa normal a cada dia. Os pulmões se encontram na cavidade torácica envoltos pela pleura, um "saco" fino de tecido que reveste a caixa torácica, de um lado, e se fixa à superficie dos pulmões, de outro. Quando a caixa torácica se expande durante a inspiração, uma pressão negativa criada no saco pleural infla o pulmão.

As vias aéreas são constituídas por um conjunto de tubos cujo diâmetro decresce progressivamente. Consiste na traqueia, grandes e pequenos brônquios e bronquíolos menores (Fig. 24.5). No final dos bronquíolos, existem os alvéolos pulmonares – estruturas alinhadas com o endotélio e cobertas com um filme de surfactante – cujo principal componente é a dipalmitilfosfatidilcolina (Cap. 27). O surfactante diminui a tensão superficial do alvéolo. A troca gasosa ocorre no alvéolo.

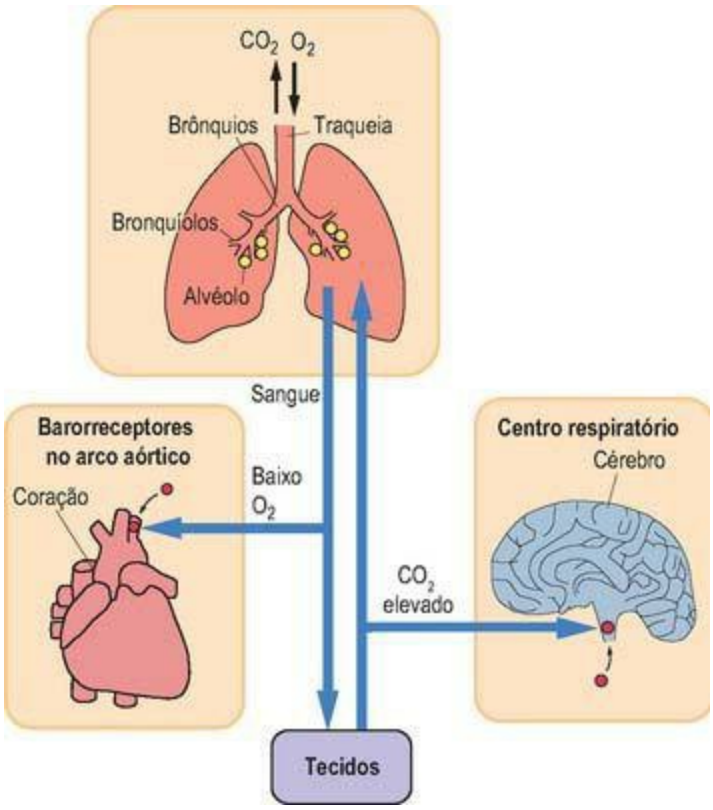


Fig. 24.5 Os pulmões e a regulação da taxa respiratória pela pCO_2 e pela pO_2. A ventilação e a perfusão pulmonares são os principais fatores que controlam a troca gasosa. A pCO_2 regula a taxa de ventilação por meio dos quimiorreceptores centrais no tronco cerebral. Quando a pO_2 diminui, este controle muda para os receptores periféricos sensíveis a pO_2 nos corpos carotídeos e no arco aórtico.

A frequência respiratória é controlada pelo centro respiratório localizado no tronco cerebral. Tanto a pO_2 como a pCO_2 afetam a taxa de ventilação, o centro respiratório e, deste modo, a frequência respiratória: o centro respiratório possui quimiorreceptores sensíveis a pCO_2 e ao pH.

Sob condições normais, não é a pO_2 que estimula a ventilação, mas um aumento da pCO_2 ou uma redução do pH. No entanto, quando a pO_2 cai e ocorre hipóxia, inicia-se um controle da ventilação por meio de um grupo de receptores localizados nos corpos carotídeos no arco aórtico. Quando a pO_2 arterial cai abaixo de 8 kPa (60 mmHg), este controle por hipóxia se torna o principal mecanismo de controle da taxa de ventilação. Pessoas que sofrem de hipóxia devido a uma doença pulmonar crônica dependem do controle por hipóxia para manterem sua taxa de ventilação (ver quadro clínico).



A DETERMINAÇÃO DE GASES NO SANGUE

A chamada "medida de gases no sangue ou gasometria" é uma investigação de primeira linha importante. Na insuficiência respiratória, os resultados de tais determinações consistem também em um guia essencial para a oxigenioterapia e ventilação assistida.

Essas medidas são realizadas em uma amostra de sangue arterial, coletada geralmente da artéria radial no antebraço. A expressão "gasometria" significa medidas do pO_2, pCO_2 e pH (ou concentração do íon hidrogênio), dos quais se calcula a concentração de bicarbonato usando a equação de Henderson-Hasselbach. Diversos outros índices também são computados: quantidade total de tampões no sangue (chamada de base tampão) e a diferença entre a quantidade desejada (normal) de tampões no sangue e a quantidade real (excesso de base). Os valores de referência para pH, pO_2, pCO_2 são dados na Tabela 24.2.

Tabela 24.2 Valores de referênda para a gasometria no sangue. Os principais valores são de pH, pCO_2 e pO_2; a concentração de bicarbonato é calculada dos valores do pH e pCO_2; pH abaixo de 7,0 ou acima de 7,7 coloca a vida em risco.

Faixa de referênda para resultados de gasometria no sangue		
	Arterial	**Venoso**
$[H^+]$	36-43 mmol/L	35-45 mmol/L

PH	7,37-7,44	7,35-7,45
pCO_2	4,6-6,0 kPa	4,8-6,7 kPa
pO_2	10,5-13,5 kPa	4,0-6,7 kPa
bicarbonato	19-24 mmol/L	

A ALCALOSE RESPIRATÓRIA É CAUSADA POR HIPERVENTILAÇÃO

Um homem com 25 anos de idade foi admitido num hospital com crise asmática. O pico da taxa de fluxo respiratório medido foi 75% de sua capacidade máxima. Os valores de sua gasometria foram pO_2 9,3 kPa (70 mmHg) e pCO_2 4,0 kPa (30 mmHg), com pH em 7,5 (concentração de hidrogênio iônico de 42 nmol/L). Ele foi tratado por nebulização com salbutamol, um estimulante β_2-adrenérgico (Cap. 41) que é um broncodilatador, e apresentou uma boa recuperação.

Comentário. A gasometria deste paciente mostra uma alcalose respiratória branda causada por hiperventilação e pelo CO_2 expirado. A alcalose respiratória causa redução nos níveis séricos de cálcio ionizado que leva a irritabilidade neuromuscular. Alteração ventilatória que leva à retenção de CO_2 e acidose respiratória é comum em casos de asma aguda. Os valores de referência encontram-se na Tabela 24.2.

A ventilação e a perfusão pulmonar são os principais fatores que determinam a troca de gases

O suprimento sanguíneo aos alvéolos é realizado pelas artérias pulmonares, que levam o sangue não oxigenado vindo da periferia através do ventrículo direito. Após oxigenação nos pulmões, o sangue flui através das veias pulmonares para o átrio esquerdo. Nos capilares alveolares dos pulmões, o sangue recebe oxigênio, que se difunde através da parede alveolar do ar inspirado; ao mesmo tempo, o CO_2 se difunde do sangue para os alvéolos (Fig. 24.5) e é removido pelo ar expirado.

A ACIDOSE RESPIRATÓRIA OCORRE EM DOENÇAS PULMONARES CRÔNICAS

Uma mulher com 56 anos de idade foi admitida numa enfermaria com crescente falta de ar. Ela vinha fumando 20 cigarros por dia nos últimos 25 anos e relatava crises frequentes de “bronquite de inverno”. A gasometria revelou uma pO_2 de 6 kPa (45 mmHg), pCO_2 de 8,4 kPa (53 mmHg) e pH de 7,35 (concentração de hidrogênio iônico de 51 nmol/L); a concentração de bicarbonato foi de 35 mmol/L (valores de referência na Tabela 24.2).

Comentário. Esta paciente apresentou uma exacerbação da doença pulmonar obstrutiva crônica e uma acidose respiratória. Sua pCO_2 estava elevada e sua ventilação estava, provavelmente, dependente do controle por hipóxia. O bicarbonato também estava elevado como consequência da compensação metabólica da acidose respiratória. Deve-se ter cuidado no tratamento de tais pacientes

com concentrações elevadas de oxigênio porque o aumento da pO_2 pode remover o controle por hipóxia e provocar depressão respiratória. É obrigatório monitorar a pO_2 e a pCO_2 arteriais, na oxigenioterapia. Esta paciente foi tratada com êxito com uma concentração de oxigênio de 28%.

A taxa de difusão dos gases para dentro e para fora do sangue é determinada pelo gradiente de pressão parcial entre o ar alveolar e o sangue arterial. A Tabela 24.3 mostra as pressões parciais do oxigênio (pO_2) e do dióxido de carbono (pCO_2) nos pulmões. Comparadas com o ar atmosférico, a pCO_2 no ar alveolar é ligeiramente superior e a pO_2 é ligeiramente inferior (isto é devido à pressão do vapor de água). O dióxido de carbono é muito mais solúvel do que o oxigênio na água e se equilibra com o sangue muito mais depressa. Portanto, quando ocorrem problemas, observamos primeiro uma redução da pO_2 (hipóxia). Um aumento da pCO_2 (hipercapnia) ocorre posteriormente e em geral indica uma doença mais grave.

Tabela 24.3 Pressões parciais do oxigênio e do dióxido de carbono no ar atmosférico, alvéolos pulmonares e sangue. Os gradientes de pressões parciais determinam a difusão dos gases pela barreira alvéolo/san-gue (1 kPa = 7,5 mmHg).

	Ar seco	Alvéolo	Artérias sistêmicas	Tecido
pO_2	21,2 kPa	13,7 kPa	12 kPa	5,3 kPa
pCO_2	<0,13 kPa	5,3 kPa	5,3 kPa	6 kPa
Vapor de água		6,3 kPa		

Outro fator importante determinante da troca gasosa é a taxa com que o sangue flui através dos pulmões (a taxa de perfusão). Normalmente, a taxa de ventilação alveolar é aproximadamente de 4 L/min e a de perfusão de 5 L/min (a razão da ventilação para a perfusão (Va/Q) é 0,8). Em condições patológicas, algumas áreas do pulmão podem estar bem-perfundidas, mas pouco ventiladas. Isto ocorre quando alguns alvéolos colapsam e não conseguem realizar a troca gasosa. Como consequência, a pO_2 no sangue diminui porque não existe difusão de oxigênio do ar alveolar. A presença de sangue pobre em oxigênio na circulação arterial é conhecida como uma condição de "shunt". Por sua vez, quando a ventilação é adequada, mas a perfusão é pobre, a troca de gases pode não ocorrer: em tais casos, parte dos pulmões se comporta como se não tivesse nenhum alvéolo; formando um "espaço morto fisiológico" (Tabela 24.4). Exemplos de condições relacionadas à má ventilação, má perfusão ou a combinação de ambas, são dados a seguir:

- deformidades da caixa torácica prejudicam a ventilação por limitação do movimento dos pulmões;
- traumatismos de tórax podem reduzir a ventilação como consequência de colapso pulmonar; os alvéolos podem ser realmente destruídos no enfisema pulmonar; síntese inadequada de surfactante leva ao colapso dos alvéolos e à síndrome da insuficiência respiratória;
- a árvore brônquica pode ser mecanicamente obstruída por objetos inalados ou estreitada por um tumor em crescimento: isto prejudica a ventilação;

- na asma ocorre constrição brônquica;
- a eficiência ventilatória pode ser reduzida por elasticidade pulmonar prejudicada ou disfunção de músculos relevantes (o diafragma e os músculos intercostais da parede torácica);
- a difusão dos gases fica prejudicada na presença de líquidos nos alvéolos (edema pulmonar);
- o movimento pulmonar é afetado por defeitos no controle neural;
- a perfusão pulmonar fica comprometida com problemas circulatórios tais como choque e insuficiência cardíaca.

Tabela 24.4 As pressões parciais de oxigênio e dióxido de carbono no sangue dependem da perfusão e ventilação pulmonares.

	pO_2 alveolar	pCO_2 alveolar	pO_2 arterial	pCO_2 arterial	Comentário
Má ventilação, perfusão adequada	diminuída	aumentada	diminuída	normal	*shunt* fisiológico
Ventilação adequada, má perfusão	aumentada	diminuída	diminuída*	aumentada*	espaço morto fisiológico

Transporte do dióxido de carbono pelos eritrócitos

O corpo produz CO_2 numa taxa de 200 a 800 mL/min. O CO_2 se dissolve em água e gera ácido carbônico, que por sua vez se dissocia em íons hidrogênio e bicarbonato: Desta maneira, CO_2 gera grandes quantidades de íon hidrogênio:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Os eritrócitos transportam o CO2 para os pulmões

Já sabemos que, no plasma, a reação anteriormente descrita não é enzimática e ocorre lentamente, gerando quantidades muito pequenas de ácido carbônico, que permanecem em equilíbrio com a grande quantidade de CO_2 dissolvida. A mesma reação nos eritrócitos é catalisada pela anidrase carbônica, que "fixa" o CO_2 como bicarbonato. O íon hidrogênio gerado é tamponado pela hemoglobina.

O bicarbonato produzido pela anidrase carbônica nos eritrócitos se move para o plasma em troca do íon cloreto (conhecido como "desvio do cloreto") (Fig. 24.6). Aproximadamente 70% de todo o CO_2 produzido nos tecidos se torna bicarbonato; quase 20% são carregados fixados à hemoglobina como grupos carbamino nas moléculas de hemoglobinas (Cap. 5) e apenas 10% permanecem dissolvidos no plasma.

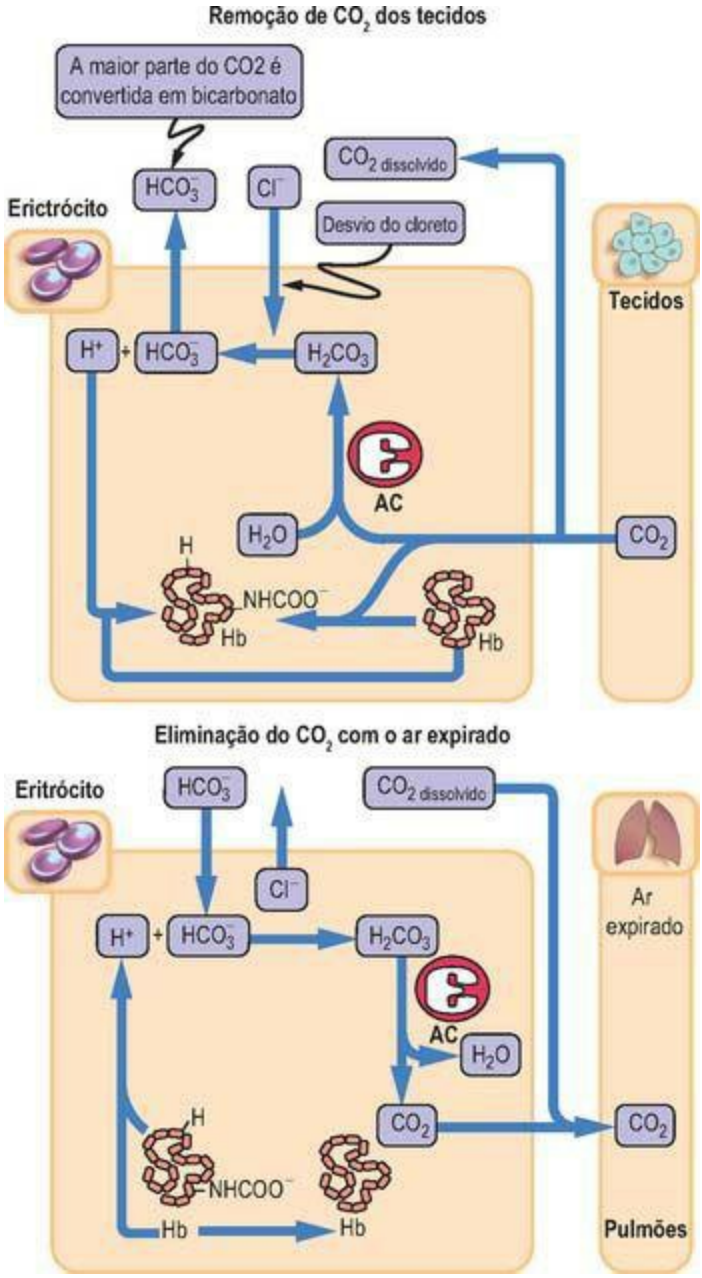


Fig. 24.6 O eritrócito e o transporte de CO_2. A anidrase carbônica (AC) do eritrócito converte a maioria do CO_2 produzido nos tecidos em bicarbonato para ser transportado para os pulmões; aproximadamente 20% da quantidade total é transportada ligada à hemoglobina e o restante como gás dissolvido no plasma.

Nos pulmões, altas pO_2 facilitam a dissociação do CO_2 da hemoglobina. Isto é conhecido como efeito Haldane. A hemoglobina libera seu íon hidrogênio, que reage com o bicarbonato formando ácido carbônico, o qual libera CO_2.

COMO OS RINS LIDAM COM O BICARBONATO

Os rins exercem função essencial no controle da concentração plasmática de bicarbonato e na remoção de íon hidrogênio. Assim como os eritrócitos, as células tubulares renais (proximais e distais) contêm anidrase carbônica.

Os túbulos proximais reabsorvem bicarbonato

O bicarbonato é reabsorvido no túbulo proximal e a urina quase não apresenta bicarbonato. As superfícies das células tubulares renais voltadas para a luz dos túbulos são impermeáveis ao bicarbonato. O bicarbonato filtrado se associa ao íon hidrogênio secretado pelas células formando ácido carbônico, que é então convertido em CO_2 pela anidrase carbônica localizada na membrana luminal. O CO_2 se difunde para as células onde a anidrase carbônica intracelular o converte de volta em ácido carbônico, que se dissocia de novo nos íons hidrogênio e bicarbonato. O bicarbonato retorna ao plasma e o íon hidrogênio é secretado na luz tubular para se combinar com outro íon bicarbonato filtrado. Observe que neste processo o íon hidrogênio é empregado apenas para auxiliar a reabsorção do bicarbonato – não ocorre excreção líquida de íon hidrogênio (Fig. 24.7).

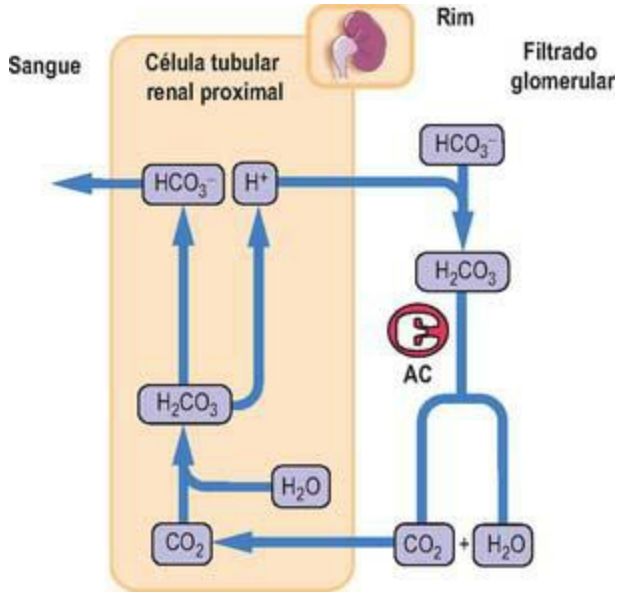


Fig. 24.7 Reabsorção de bicarbonato no rim. A reabsorção do bicarbonato ocorre no túbulo proximal. Neste segmento, não ocorre excreção líquida de íon hidrogênio. AC, anidrase carbônica.

A ANEMIA CAUSA FADIGA E FALTA DE AR

Um homem com 35 anos de idade apresentou falta de ar depois de subir dois andares de escada. Sua radiografia de tórax estava normal assim como o exame do coração e eletrocardiograma; os gases sanguíneos estavam normais. Ele estava usando um anti-inflamatório não esteroide (AINE) para dor articular. Seu hemograma revelou hemoglobina de 10 g/dL (faixa de referência entre 13 e 18 g/dL) e um volume corpuscular médio reduzido de 72 dL (faixa de referência entre 80 e 96 dL). A concentração de ferritina sérica estava baixa, a 10 µg/L (faixa de referência de 14-200 µg/L).

Comentário. Este paciente apresentava anemia por deficiência crônica de ferro. A anemia pode se manifestar com sintomas gerais como fadiga ou falta de ar. O paciente apresentava úlcera péptica causada pelo AINE com perda de sangue pelo trato gastrointestinal.

Os túbulos distais geram bicarbonato e excretam íon hidrogênio

No túbulo distal ocorre geração de bicarbonato. O mecanismo é idêntico ao da reabsorção de bicarbonato, mas desta vez ocorre tanto perda líquida de íons hidrogênio do corpo como um ganho líquido de bicarbonato. O CO_2 se difunde livremente para as células. No túbulo distal, a anidrase carbônica o converte em ácido carbônico, que se dissocia em íon hidrogênio e bicarbonato. O bicarbonato é transportado para o plasma e o íon hidrogênio é secretado na luz tubular. No entanto, nenhum bicarbonato é encontrado na luz do túbulo distal (todo o bicarbonato foi reabsorvido anteriormente) e os íons hidrogênio são tamponados por íons fosfatos presentes no filtrado e pela amônia formada nos túbulos proximais. Subsequentemente são excretados na urina (Fig. 24.8).

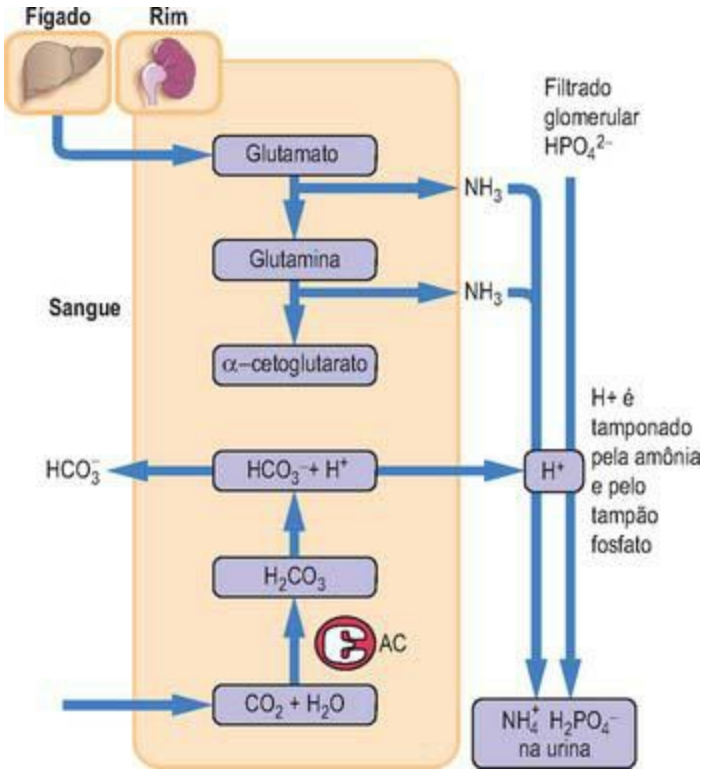


Fig. 24.8 Excreção de íon hidrogênio pelo rim. A excreção do íon hidrogênio ocorre nos túbulos distais. O íon hidrogênio reage com a amônia formando o íon amônio. O íon hidrogênio é também tamponado pelo fosfato. A excreção diária do íon hidrogênio é de aproximadamente 50 mmol. AC, anidrase carbônica.

A amônia é formada na transformação de glutamina em ácido glutâmico numa reação catalisada pela glutaminase. A amônia se difunde pela membrana luminal e o íon hidrogênio é retido dentro do túbulo sob a forma de íon amônio (NH_4^+) para o qual a membrana é impermeável.

Alterações no controle renal de bicarbonato e de íon hidrogênio levam a um grupo de distúrbios relativamente raros conhecido como acidose tubular renal (ATR). A ATR distal acontece devido à dificuldade de excreção do íon hidrogênio no túbulo distal, e a ATR proximal ocorre como consequência da reabsorção deficiente de bicarbonato. A ATR proximal é geralmente acompanhada de outros defeitos em mecanismos de transporte proximais (conhecidos como síndrome de Fanconi).

DISTÚRBIOS DO EQUILÍBRIO ACIDOBÁSICO

O pulmão e o rim atuam em conjunto para minimizar mudanças no pH plasmático e podem compensar um ao outro quando surgirem problemas

Os distúrbios do equilíbrio acidobásico podem ser provocados por problemas primários que afetam o componente respiratório ou a concentração do bicarbonato (componente metabólico). A equação de Henderson-Hasselbach indica que a acidose é acompanhada por uma proporção aumentada do bicarbonato plasmático com a pCO_2, e alcalose por uma proporção diminuída.

DISTÚRBIOS RESPIRATÓRIoS E METABÓLICoS DO EQUILÍBRIO ACIDOBÁSICO PODEM OCORRER SIMULTANEAMENTE

Durante a ressuscitação de um homem de 60 anos de idade com parada cardiorrespiratória, a análise da gasometria revelou pH de 7,0 (concentração do íon hidrogênio de 100 nmol/L e pCO_2 de 7,5 kPa (52 mmHg). A concentração de bicarbonato era de 11 mmol/L. A pO_2 ficou em 12,1 kPa (91 mmHg) durante o tratamento com 48% de oxigênio.

Comentário. Este paciente apresentou um distúrbio misto: uma acidose respiratória causada pela falta de ventilação e uma acidose metabólica causada por hipóxia, que ocorreu antes de ser instituída a terapia com oxigênio. A acidose foi causada por acúmulo de ácido lático: a concentração do lactato medida foi de 7 mmol/L (faixa de referência de 0,7-1,8 mmol/L [6-16 mg/dL]). Os termos acidose e alcalose não somente descrevem alterações no pH sanguíneo: eles mostram os processos que evoluem para estas alterações. Portanto, em alguns casos, dois processos independentes podem ocorrer: por exemplo, um paciente pode ser admitido em um hospital com cetoacidose diabética e um enfisema concomitante causando acidose respiratória. O resultado final pode ser uma alteração mais grave no pH do que seria esperado com um distúrbio simples (Tabela 24.5). Qualquer associação de distúrbios pode ocorrer; o conhecimento de um médico experiente, em geral, é necessário para que se estabeleça um diagnóstico deste tipo.

Acidose

Clinicamente, a acidose é uma alteração muito mais comum do que a alcalose (Tabela 24.5) e pode ser subdividida em respiratória ou metabólica.

A acidose respiratória ocorre mais frequentemente na doença pulmonar e resulta de redução na ventilação

A causa mais comum é a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Um ataque asmático grave pode resultar em acidose respiratória devido à constrição brônquica. A acidose respiratória é frequente também na hipóxia (insuficiência respiratória): neste caso, um aumento da pCO_2 ocorre com redução da pO_2.

A acidose metabólica resulta da produção excessiva, metabolismo ineficiente ou excreção insuficiente de ácidos não voláteis

Um exemplo clássico de acidose metabólica é a cetoacidose diabética, quando cetoácidos, ácido acetoacético e ácido β-hidroxibutírico acumulam no plasma, (Cap. 21). A acidose também pode ocorrer durante esforços físicos extremos, quando existe acúmulo de lactato gerado pelo metabolismo muscular; em circunstâncias normais, o lactato é rapidamente metabolizado após parada do exercício. No entanto, quando grandes quantidades de lactato são produzidas como consequência de hipóxia, a acidose lática pode se tornar um risco à vida, como acontece, por exemplo, no choque.

A excreção de ácidos não voláteis também está prejudicada na insuficiência renal e isto também causa acidose metabólica. A insuficiência renal se desenvolve quando a perfusão dos rins não é adequada (p. ex., traumatismo, choque ou desidratação), ou se existe uma doença renal intrínseca como a glomerulonefrite (reação inflamatória no tecido tubular renal; Cap. 23 e quadro da pág. 321).

Tabela 24.5 Alterações do equilíbrio acidobásico dos tipos simples e mistas. Os distúrbios acidobásicas mistos resultam numa alteração maior do pH sanguíneo do que nos distúrbios simples; podem apresentar dificuldades no diagnóstico

Distúrbio	pH	pCO_2	Bicarbonato
acidose metabólica	diminuição	diminuição (compensação respiratória)	diminuição (alteração primária)
acidose respiratória	diminuição	aumento (alteração primária)	aumento (compensação metabólica)
acidose mista respiratória e metabólica	grande diminuição	aumento (acidose respiratória)	diminuição (acidose metabólica)

Alcalose respiratória, metabólica e mista

Distúrbio	pH	pCO_2	Bicarbonato
alcalose metabólica	aumento	aumento (compensação respiratória)	aumento (alteração primária)
alcalose respiratória	aumento	diminuição (alteração primária)	diminuição (compensação metabólica)
alcalose mista respiratória e metabólica	grande aumento	diminuição (alcalose respiratória)	aumento (acidose metabólica)

DESORDENS DO EQUILÍBRIO aCIDOBÁSICO AFETAM A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE POTÁSSIO

O potássio afeta a contratilidade do coração e tanto níveis plasmáticos muito elevados quanto reduzidos demais (hipercalemia ou hipocalemia, respectivamente) representam risco à vida. Os efeitos do potássio na função cardíaca podem ser observados no eletrocardiograma. A hipocalemia leva a um aumento na excreção do íon hidrogênio e, consequentemente, a uma alcalose metabólica. O contrário também é verdadeiro: a alcalose metabólica leva a um aumento na excreção renal de potássio e hipocalemia. A concentração plasmática do potássio deve ser verificada sempre que houver suspeita de um desequilíbrio acidobásico (Fig. 23.15).

A perda excessiva de bicarbonato também pode ser uma causa de acidose metabólica. Isto pode ocorrer quando o mecanismo de reabsorção renal está defeituoso, mas é mais comum quando o bicarbonato presente no líquido intestinal é perdido como resultado de diarreia intensa ou drenagem cirúrgica após cirurgia intestinal.

Alcalose

A alcalose é mais rara do que a acidose (Tabelas 24.6 e 24.7)

Tabela 24.6 A compensação respiratória e metabólica dos distúrbios acidobásicos minimiza as alterações no pH sanguíneo. Uma alteração no componente respiratório leva à compensação metabólica e uma alteração no componente metabólico estimula a compensação respiratória. A compensação metabólica envolve uma mudança no controle renal do bicarbonato e a compensação respiratória envolve mudanças na taxa de ventilação. Um aumento ou redução compensatória na taxa de ventilação (hiperventilação ou hipoventilação) é observado em minutos; por sua vez, um ajuste na taxa de reabsorção de bicarbonato pode levar dias.

Distúrbio acidobásico	Alteração primária	Alteração compensatória	Período da alteração compensatória
acidose metabólica	redução na concentração plasmática de bicarbonato	redução da pCO_2 (hiperventilação)	minutos/horas
alcalose metabólica	aumento na concentração plasmática de bicarbonato	aumento da pCO_2 (hipoventilação)	minutos/horas
acidose respiratória	aumento da pCO_2	aumento na reabsorção renal de bicarbonato aumento na concentração plasmática de bicarbonato	dias
alcalose respiratória	redução da pCO_2	diminuição da reabsorção renal do bicarbonato diminuição da concentração plasmática do bicarbonato	dias

Tabela 24.7 Causas clínicas dos distúrbios acidobásicos. Os distúrbios do equilíbrio acidobásico são a acidose e a alcalose: podem ser tanto respiratória como metabólica. A acidose respiratória é comum e é causada principalmente por doenças do pulmão que afetam a troca gasosa. A alcalose respiratória é mais rara e é causada por hiperventilação que reduz a pCO_2. A acidose metabólica é comum e resulta tanto da produção em excesso como da retenção de ácidos não voláteis na circulação. A alcalose metabólica é mais rara: suas causas mais comuns são vômitos e aspiração gástrica, ambas causando perda de íon hidrogênio pelo estômago.

Acidose metabólica	Acidose respiratória	Alcalose metabólica	Alcalose respiratória
diabetes melito (cetoacidose)	doença obstrutiva crônica das vias aéreas	vômitos (perda de íon hidrogênio)	hiperventilação (ansiedade, febre)
acidose lática (ácido lático)	asma grave	aspiração nasogástrica (perda do íon hidrogênio)	doenças pulmonares associadas hiperventilação
insuficiência renal (ácidos inorgânicos)	parada cardíaca	hipocalemia	anemia
diarreia grave (perda de bicarbonato)	depressão do centro respiratório (drogas, p. ex., opioides)	administração intravenosa de bicarbonato (p. ex., depois de uma parada cardíaca)	envenenamento por salicilato
drenagem cirúrgica do intestino (perda de bicarbonato)	fraqueza dos músculos respiratórios. (p. ex., poliomielite, esclerose múltipla)		
perda renal de bicarbonato (acidose tubular renal tipo 2 – rara)	deformidades do tórax		
redução da excreção renal de H^+ (acidose tubular renal tipo 1 – rara)	obstrução de vias aéreas		

O VÔMITO PODE CAUSAR ALCALOSE METABÓLICA

Um homem de 47 anos de idade chegou a uma unidade ambulatorial com histórico de vômitos profusos intermitentes e perda de peso. Ele apresentava taquicardia, redução do turgor tecidual,

hipotensão e um borborigmo na ausculta abdominal. Seu pH sanguíneo era 7,55 (concentração do íon hidrogênio de 28 nmol/L) e pCO_2 de 6,4 kPa (48 mmHg). Sua concentração de bicarbonato era de 35 mmo/L e havia também hiponatremia e hipocalemia. Apesar da alcalose sistêmica, o pH da urina estava apenas em 3,5.

Comentário. Este paciente se apresentava com alcalose metabólica causada pela perda de íon hidrogênio pelo vômito. As investigações mostraram uma obstrução do débito gástrico na entrada do estômago causada pela cicatrização de uma ulceração péptica crônica. Ele foi submetido a uma cirurgia para corrigir uma estenose pilórica, com boa evolução. Observe o aumento de pCO_2 como resultado da compensação respiratória da alcalose metabólica. A urina paradoxalmente ácida resulta talvez da depleção de cloreto, o que então limita a reabsorção de sódio no ramo ascendente espesso da alça de Henle, de modo que o sódio é então trocado por íons hidrogênio e potássio no néfron distal.

Uma alcalose respiratória leve pode resultar de hiperventilação durante exercícios, ataques de ansiedade ou febre. Também pode ocorrer na gestação. A alcalose metabólica está frequentemente associada à concentração anormalmente baixa de potássio no plasma como resultado do tamponamento celular. A entrada ou saída do íon potássio da célula está associada ao movimento de íon hidrogênio numa direção oposta. Assim, a alcalose pode provocar hipocalemia (Cap. 23), enquanto a hipocalemia pode levar à alcalose. Alcalose metabólica grave pode também resultar de perda maciça de íon hidrogênio pelo estômago durante o vômito (quadro da pág. 335), ou em consequência de aspiração nasogástrica após cirurgia. Por último, também pode ocorrer após administração intravenosa de doses excessivas de bicarbonato, por exemplo, na ressuscitação após uma parada cardíaca.

Resumo

- A manutenção da concentração do íon hidrogênio dentro de uma faixa restrita é vital para a sobrevivência celular.
- O equilíbrio acidobásico é regulado pela ação conjunta dos pulmões e dos rins. Os eritrócitos desempenham função importante no transporte de dióxido de carbono no sangue.
- Os principais tampões no sangue são a hemoglobina e o bicarbonato, enquanto nas células são as proteínas e o fosfato. O sistema tampão do bicarbonato se comunica com o ar atmosférico.
- Os distúrbios acidobásicos são a acidose e a alcalose, que podem ser metabólica ou respiratória.
- As determinações de pH, pCO_2 e bicarbonato e pO_2 são investigações de primeira linha e são frequentemente solicitadas nas emergências.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Descreva como o tampão bicarbonato lida com uma adição de ácido ao sistema.
2. Compare o controle do bicarbonato pelos túbulos proximal e distal no rim.
3. Explique a função da ventilação nos distúrbios acidobásicos.
4. Que distúrbios do equilíbrio acidobásico podem estar associados a uma cirurgia gastrointestinal?
5. Discuta a associação entre os distúrbios acidobásicos e a concentração plasmática de potássio.

Leituras sugeridas

Corey HE. Bench-to-bedside review: fundamental principles of acid–base balance. *Crit Care*. 2005;9:184-192.

Kellum JA. Disorders of acid–base balance. *Crit Care Med*. 2007;35:2630-2636.

Metabolismo do Cálcio e do Osso

W.D. Fraser, M.H. Dominiczak

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a composição química do osso e o processo de mineralização.
- Reconhecer as principais células ósseas e suas interações no ciclo de remodelamento ósseo.
- Compreender o papel dos principais fatores que contribuem para a regulação da concentração de cálcio no soro.
- Conhecer as causas da hipercalcemia e da hipocalcemia.
- Explicar o papel principal da proteína relacionada ao paratormônio na hipercalcemia maligna.
- Entender o papel da vitamina D e o seu metabolismo em condições normais e patológicas.
- Definir a osteoporose, suas causas e tratamento.
- Identificar as causas da osteomalácia e sua manifestação em adultos.

ESTRUTURA ÓSSEA E REMODELAMENTO ÓSSEO

O osso é um tecido conjuntivo especializado que, juntamente com a cartilagem, forma o sistema esquelético. Além de fornecer suporte e proteção, é um local de intensa atividade metabólica. Dois tipos de ossos são conhecidos: o osso espesso, denso e calcificado, localizado externamente (osso cortical ou compacto); e o osso esponjoso, uma rede de tecido calcificado com aspecto de favo de mel localizada na parte interna do osso (osso trabecular).

O colágeno e a hidroxiapatita são os principais componentes da matriz óssea

O colágeno do tipo I corresponde a 90% do total de proteínas da matriz óssea. Os cristais de hidroxiapatita ricos em cálcio ($Ca_{10}[PO_4]_6[OH]_2$) são encontrados dentro e entre as fibras de colágeno. A associação do hidroxiapatita com o colágeno e a calcificação óssea são controladas, em parte, pela presença de glicoproteínas e proteoglicanos com alta capacidade de ligação iônica. As fibras de colágeno orientam-se de forma a apresentar maior densidade por unidade de volume e estão dispostas em camadas, confeccionando uma estrutura lamelar que pode ser observada ao microscópio. As modificações pós-traducionais do colágeno resultam na formação de ligações cruzadas de pirrol e piridinolina intra e intermoleculares, que têm um papel importante na resistência fibrilar e na mineralização da matriz. Esta microarquitetura permite ao osso funcionar como o principal reservatório de cálcio do corpo. A matriz orgânica não calcificada presente no interior do osso, conhecida como osteoide, se torna mineralizada por meio de dois mecanismos.

No espaço extracelular ósseo, vesículas derivadas de membranas plasmáticas presentes na matriz atuam como um foco de deposição de fosfato de cálcio. A membrana interna destas vesículas, rica em lipídios, é o centro de formação dos cristais de hidroxiapatita. O processo de cristalização acontece rapidamente, e por fim destrói a membrana vesicular, resultando em um agregado de cristais de hidroxiapatita. Os osteoblastos (células formadoras dos ossos) também podem secretar um conjunto pré-organizado de proteínas da matriz, que rapidamente se mineraliza. Tais proteínas se combinam com as vesículas da matriz para formar o tecido mineralizado. As moléculas que inibem este processo, tais como o pirofosfato, existem dentro do ambiente da matriz. A fosfatase alcalina secretada pelos osteoblastos destrói o pirofosfato, possibilitando a mineralização.

A mineralização é altamente dependente de um suprimento adequado de cálcio e fosfato. Quando há carência destes minerais, a porcentagem de osteoide (a matriz orgânica não mineralizada) dentro do osso aumenta, resultando na condição clínica conhecida como osteomalácia.

Poucas quantidades de cálcio são trocadas diariamente entre o osso e o líquido extracelular (LEC) como resultado do remodelamento ósseo constante, isto é, processos acoplados de reabsorção pelos osteoclastos (células de reabsorção óssea) e a formação pelos osteoblastos (Fig. 25.1). Esta troca mantém um relativo equilíbrio de cálcio entre os ossos recém-formados e os ossos reabsorvidos. O remodelamento ósseo é um processo acoplado de reabsorção pelos osteoclastos e formação pelos osteoblastos.

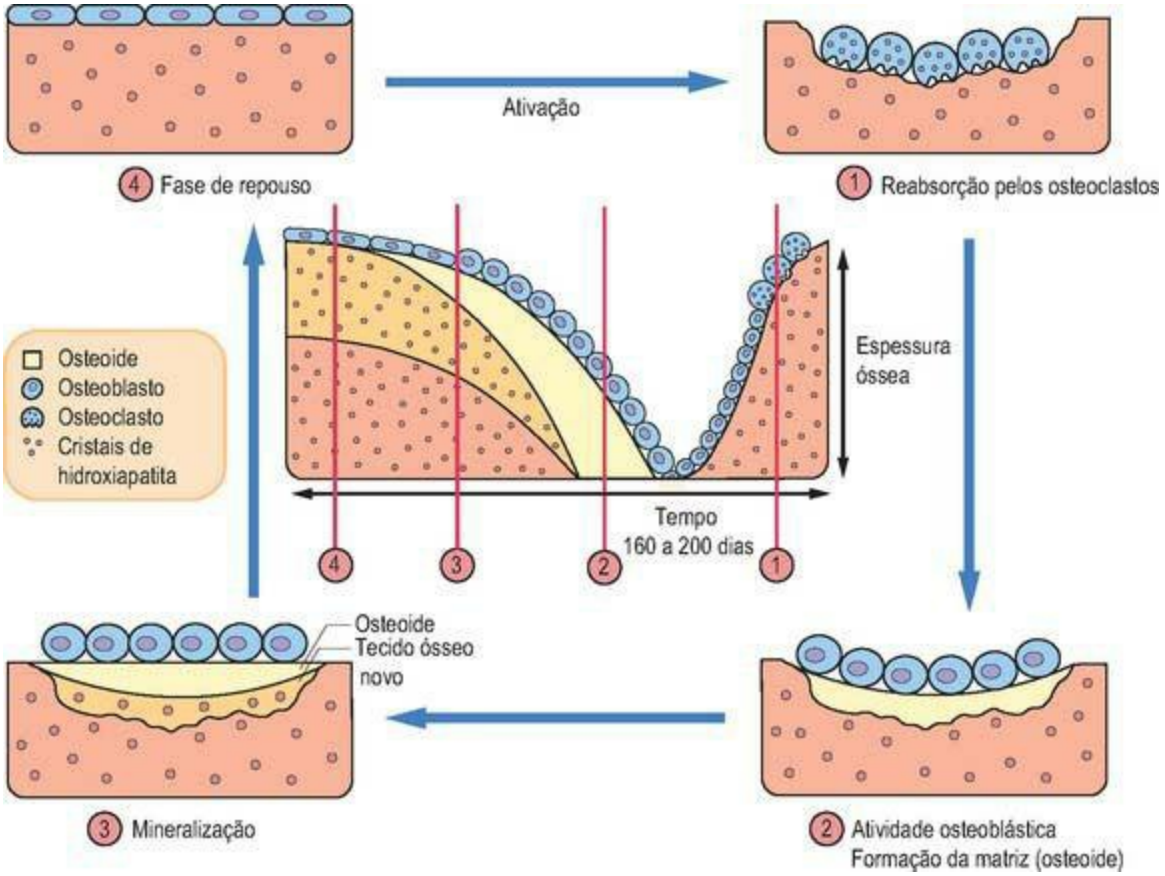


Fig. 25.1 A manutenção da massa óssea: o ciclo de remodelamento do osso. A reabsorção e a formação óssea pelos osteoclastos e osteoblastos estão acopladas.

Mudanças constantes da estrutura óssea pelo remode-lamento

O osso é uma estrutura dinâmica. Sofre adaptações mecânicas constantes. O processo é conhecido como remodelamento e é resultado de ações combinadas de dois tipos de células: os osteoblastos e os osteoclastos. O aumento da carga mecânica estimula a formação óssea e o excesso da atividade dos osteoclastos está associado a diversas doenças, em particular a osteoporose, a artrite reumatoide e a metástase no câncer.

Os fatores que afetam a reabsorção óssea estão listados na Tabela 25.1.

Tabela 25.1 Fatores que afetam a reabsorção óssea.

Fatores que afetam a reabsorção óssea	
Fatores estimulantes da reabsorção óssea	**Fatores inibitórios da reabsorção óssea**
$1,25\text{-}(OH)_2D_3$	Cálcio
PTH	Estrógenos
PTHrP	Calcitonina
PGE_2	TGF-β
IL-1 IL-6	IL-17
TNF	
Prolactina	
Corticosteroides	

Prostaglandina E2, PGE2; interleucina, IL; fatorde necrose tumoral, TNF; fator de crescimento tumoral, TGF; paratormônio, PTH; proteína relacionada ao paratormônio, PTHrP.

Osteoclastos

Os osteoclastos são as células responsáveis pela reabsorção óssea

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas (macrófagos específicos deste tecido). Eles permanecem em contato com a superfície calcificada, que foi gerada pela sua atividade de reabsorção. Os osteoclastos são derivados de células mononucleares hematopoéticas pluripotentes provenientes da medula óssea.

O receptor RANK e seu ligante RANKL são essenciais para a diferenciação, maturação e regulação dos osteoclastos

A maturação dos osteoclastos de suas células progenitoras é direcionada por fatores de crescimento, particularmente pelo fator estimulante de colônia 1 (CSF1). Outro fator essencial é a proteína receptora estruturalmente relacionada ao receptor do fator de necrose tumoral, chamada receptor ativador do fator nuclear NFkB (RANK). Este se liga à citocina relacionada ao TNF chamada ligante do RANK (RANKL). A ligação de RANKL ao RANK pode ser bloqueada pela osteoprotegerina (OPG), que também é uma proteína estruturalmente relacionada ao receptor de TNF. O RANKL e a OPG controlam a diferenciação e a ativação dos osteoclastos. O RANKL estimula enquanto a OPG inibe a reabsorção óssea. É importante ressaltar que os estrógenos induzem a síntese de OPG.

Animais geneticamente modificados que apresentam mutações direcionadas do gene que codifica a OPG desenvolvem osteoporose profunda. Camundongos *knockout* para RANKL não produzem osteoclastos e sofrem de osteopetrose apresentando um excesso de ossos espessos.

O RANK controla o osteoclasto por meio de cascatas de sinalização intracelular e fatores de transcrição

Essencialmente, o RANK prepara o osteoclasto para a reabsorção óssea. Como outros receptores de membrana (Cap. 40), ele estimula cascatas de sinalização intracelular, ativando fatores de transcrição que controlam genes. As vias de sinalização intracelular do RANK são compostas por proteínas conhecidas como moléculas adaptadoras (fatores citoplasmáticos associados ao TNF-R; TRAFs). O TRAF mobiliza outras proteínas de sinalização que ativam vias relacionadas com o NFκB e a proteína ativadora-1 (AP-1). Outras vias envolvem a quinase do N-terminal de Jun (JNK), a proteína quinase ativada por estresse p38, a quinase regulada extracelularmente (ERK) e a via da src que envolve a PI3K e a quinase Akt (Cap. 40). O resultado da ativação dos osteoclastos é a indução de genes que codificam a fosfatase ácida resistente ao tartarato, a calcitonina, a catepsina K e a integrina β_2, que controlam diretamente a reabsorção óssea. A reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos libera peptídeos de colágeno, fragmentos de ligação cruzada de piridinolina, e cálcio da matriz óssea pela produção, secreção e ação de enzimas lisossomais, colagenases e catepsinas em pH ácido. Os produtos da quebra do colágeno presentes no soro e na urina (p. ex., hidroxiprolina) e os fragmentos de colágeno (telopeptídeos amino ou carboxiterminais de ligação cruzada, NTX e CTX, respectivamente) podem ser dosados.

O paratormônio contribui para a ativação dos osteoclastos

O paratormônio (PTH) ativa os osteoclastos indiretamente via osteoblastos e calcitonina. Fatores locais como as citocinas interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral (TNF), o fator β da transformação do crescimento (TGF-β) e o interferon γ (IFN-γ) também são importantes reguladores

dos osteoclastos e atuam por meio de RANKL e OPG.

Osteoblastos

Os osteoblastos são células formadoras de ossos

As células progenitoras dos osteoblastos são derivadas do mesênquima. Os osteoblastos maduros sintetizam colágeno tipo I, osteocalcina (também conhecido como proteína Gla óssea), proteínas de adesão celular (trombospondina, fibronectina, sialoproteína óssea e osteopontina), proteoglicanos e proteínas relacionadas ao crescimento que controlam a mineralização óssea. A função e a atividade dos osteoblastos são alteradas por diversos hormônios e fatores de crescimento.

O PTH liga-se a um receptor específico, estimulando a produção de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), o transporte de íons e aminoácidos e a síntese do colágeno. O 1,25–di-hidroxicolecalciferol ($1,25(OH)_2D_3$: calcitriol) estimula a síntese de fosfatase alcalina, de proteínas específicas do osso e da matriz e pode diminuir a secreção de osteocalcina. O TGF-β, os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) do tipo 1 e 2 (IGFs) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) são reguladores autócrinos da função dos osteoblastos. Os marcadores bioquímicos séricos que refletem a função dos osteoblastos são a fosfatase alcalina específica dos ossos, a osteocalcina e os marcadores de formação do colágeno: o telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP) e os pró-peptídeos amino e carboxiterminal do pró-colágeno tipo 1 (PINP, P1CP).

As funções dos osteoblastos e dos osteoclastos estão interligadas por um processo chamado acoplamento. Por exemplo, os osteoblastos expressam RANKL na sua superfície e este interage com o RANK, expresso nas células progenitoras dos osteoclastos. Isto aumenta a diferenciação dos osteoclastos e ativa os osteoclastos maduros, fornecendo uma junção entre a formação e a reabsorção óssea.

A proteína relacionada ao receptor de LDL 5 (LRP5) é um membro da família de receptores de LDL que possui um papel importante na diferenciação dos osteoblastos (Cap. 18). A LRP5, com outros receptores, ativa a via de sinalização de Wnt levando à diferenciação celular. Esta via é importante no controle da formação de um novo osso.

Mutações do gene que codifica a LRP5 causam um aumento da massa óssea e formação de osso denso. Por outro lado, uma mutação que leve à perda da função gênica causa osteoporose.

METABOLISMO DO CÁLCIO

O osso serve como um depósito de cálcio

Na homeostase do cálcio, o osso serve como um reservatório quando há uma carência, e também como um local de armazenamento quando o corpo está repleto de cálcio.

O esqueleto contém 99% do cálcio presente no corpo na forma de hidroxiapatita; o restante está distribuído nos tecidos moles, nos dentes, e no LEC. Muitas das funções celulares e orgânicas são dependentes do controle rígido da concentração de cálcio extracelular, tais como a transmissão neural, a secreção celular, a contração muscular, a proliferação celular, a estabilidade e a permeabilidade das membranas celulares, a coagulação sanguínea e a mineralização óssea. O cálcio total do soro é mantido entre 2,2 e 2,6 mmol/L (8,8-10,4 mg/dL). O cálcio existe na circulação em três formas (Fig. 25.2):

- **Ca^{2+} ionizado:** o mais importante, a forma fisiologicamente ativa do cálcio (50% do cálcio total)

- **Ca^{2+} ligado à proteína:** a maioria do cálcio remanescente, principalmente ligada a albumina carregada negativamente (40%)

- **Ca^{2+} complexado a substâncias, tais como o citrato e o fosfato:** a menor fração (10%).

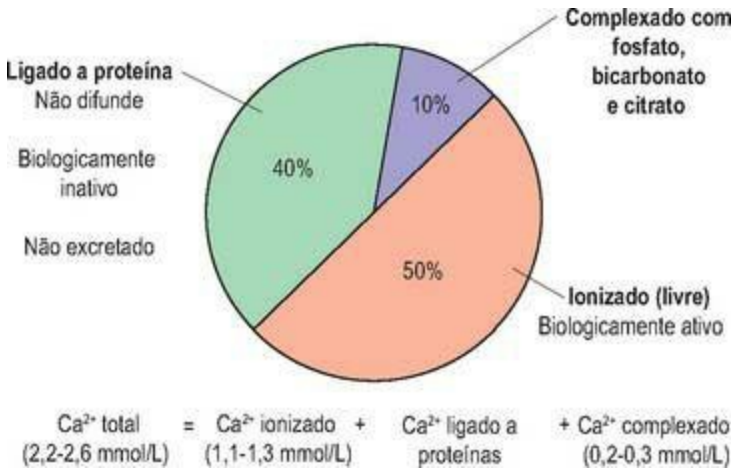


Fig. 25.2 Frações de cálcio circulantes. As três formas de cálcio circulante.

Em condições de alta concentração de proteínas séricas (como nos casos de desidratação e após estase venosa prolongada), há um aumento do cálcio ligado à proteína e do cálcio total no soro. Em condições de baixa concentração de proteínas séricas (p. ex., doenças hepáticas, síndrome nefrótica, subnutrição), há uma diminuição da concentração do cálcio ligado à proteína e do cálcio total, embora o cálcio ionizado seja mantido dentro do limite de referência: 1,1-1,3 mmol/L (4,4-5,2 mg/dL). Muitas doenças agudas e crônicas diminuem a concentração de albumina no soro, reduzindo, consequentemente, o nível de cálcio total no soro. Por causa disso, em algumas situações clínicas, é importante calcular o cálcio corrigido – o cálcio total do soro, corrigido para a concentração de albumina prevalente do paciente. Isto é obtido com uma fórmula que considera a concentração de

albumina média da população, 40 g/L (4 g/dL):

Ca^{2+} corrigido = Ca medido (mmol/L) + 0,02 (40 – albumina [g/L])

Controle hormonal da homeostase do cálcio

Paratormônio

O paratormônio responde às mudanças dos níveis de cálcio ionizado e de fosfato

Quando a concentração de Ca^{2+} plasmático diminui, o PTH é liberado pelas glândulas paratireoides, estimulando a reabsorção óssea pelos osteoclastos, a reabsorção do cálcio pelos rins e a absorção de cálcio pelo intestino delgado (mediada por $1,25(OH)_2D_3$). A secreção de PTH é regulada pelo cálcio, completando assim o ciclo da homeostase: um aumento dos níveis de cálcio diminui a secreção de PTH. Além disso, o cálcio estimula a liberação de calcitonina pela tireoide, inibindo a reabsorção óssea (Fig. 25.3).

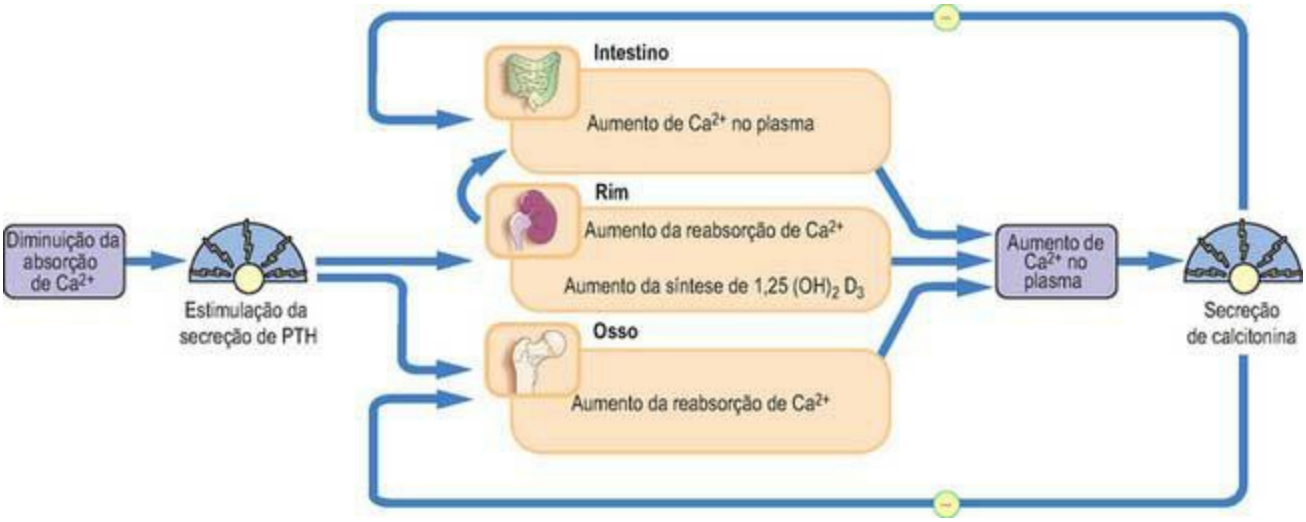


Fig. 25.3 Principais hormônios que influenciam a homeostase do cálcio. Uma diminuição da concentração de cálcio ionizado no plasma estimula a liberação de PTH; isto promove a reabsorção de Ca^{2+} pelos rins, a reabsorção óssea, e a absorção pelo intestino pelo aumento da produção de $1,25\ (OH)_2D_3$. Como resultado, a concentração de cálcio no plasma aumenta. Por sua vez, um aumento da concentração de cálcio ionizado no plasma estimula a liberação de calcitonina, que inibe a reabsorção de cálcio pelos rins e a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos.

O PTH é um hormônio peptídico de cadeia simples formado por 84 aminoácidos secretado pelas células principais das glândulas paratireoides. Sua secreção é estimulada pela baixa concentração de Ca^{2+} ionizado extracelular ou pela alta concentração de fosfato no soro. A carência de magnésio crônica pode inibir a liberação de PTH de suas vesículas secretoras, e baixas concentrações de $1,25(OH)_2D_3$ interferem na sua síntese. O $PTH_{(1-84)}$ é metabolizado principalmente em um fragmento aminoterminal biologicamente ativo, o $PTH_{(1-34)}$, e um fragmento carboxiterminal inativo, o $PTH_{(35-84)}$ (Fig. 25.4). A maioria das ações celulares clássicas do PTH é mediada pelo cAMP, que é gerado pela adenilato ciclase estimulada por proteína G.

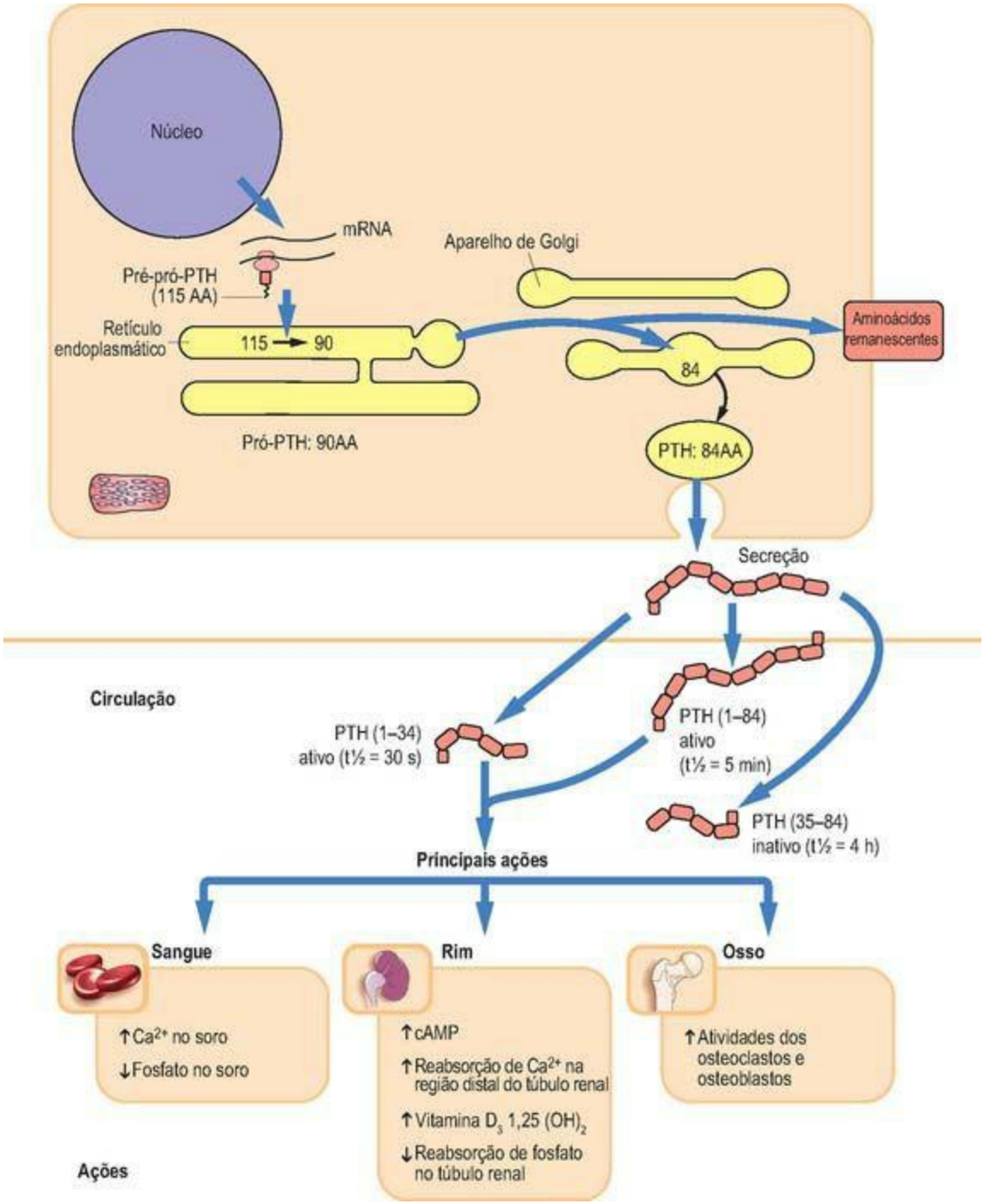


Fig. 25.4 A síntese e as principais ações do paratormônio (PTH). O PTH mobiliza o cálcio de todas as fontes disponíveis e diminui a sua excreção renal. aa: aminoácidos.

O receptor sensível ao cálcio é um receptor de superfície acoplado à proteína G

O cálcio ionizado é mantido dentro de um limite restrito por meio de um receptor extracelular sensível ao cálcio (CaSR). Este receptor está acoplado a uma proteína G (quadro da pág. 160 e Fig. 40.2) e se localiza na superfície das células principais glândula paratireoide, bem como das células C da glândula tireoide e ao longo dos túbulos renais. Pequenas mudanças nos níveis de cálcio ionizado modulam as funções celulares para manter a normocalcemia.

Vitamina D

A vitamina D é sintetizada na pele por radiação UV

A síntese e o metabolismo da vitamina D estão ilustrados na Figura 25.5. A vitamina D_2 (ergocalciferol) é sintetizada na pele pela radiação UV do ergosterol. A vitamina D_3 (colecalciferol) também é derivada da irradiação UV do 7-desidrocolesterol na pele de animais. A vitamina D_3 e seus metabólitos hidroxilados são transportados no plasma ligados a uma globulina específica, a proteína de ligação da vitamina D (DBP). A afinidade do ergocalciferol para DBP é baixa, mas a da vitamina D_3 é alta, garantindo, desta forma, a mobilização da D_3 da pele para a circulação. A vitamina D_3 também é encontrada na dieta e sua absorção está associada a outras gorduras, sendo transportada para o fígado em quilomícrons. No fígado, a vitamina D_3 é liberada dos quilomícrons pela DBP e hidroxilada na posição 25, formando o 25-hidroxicolecalciferol (25(OH)D_3, calcidiol).

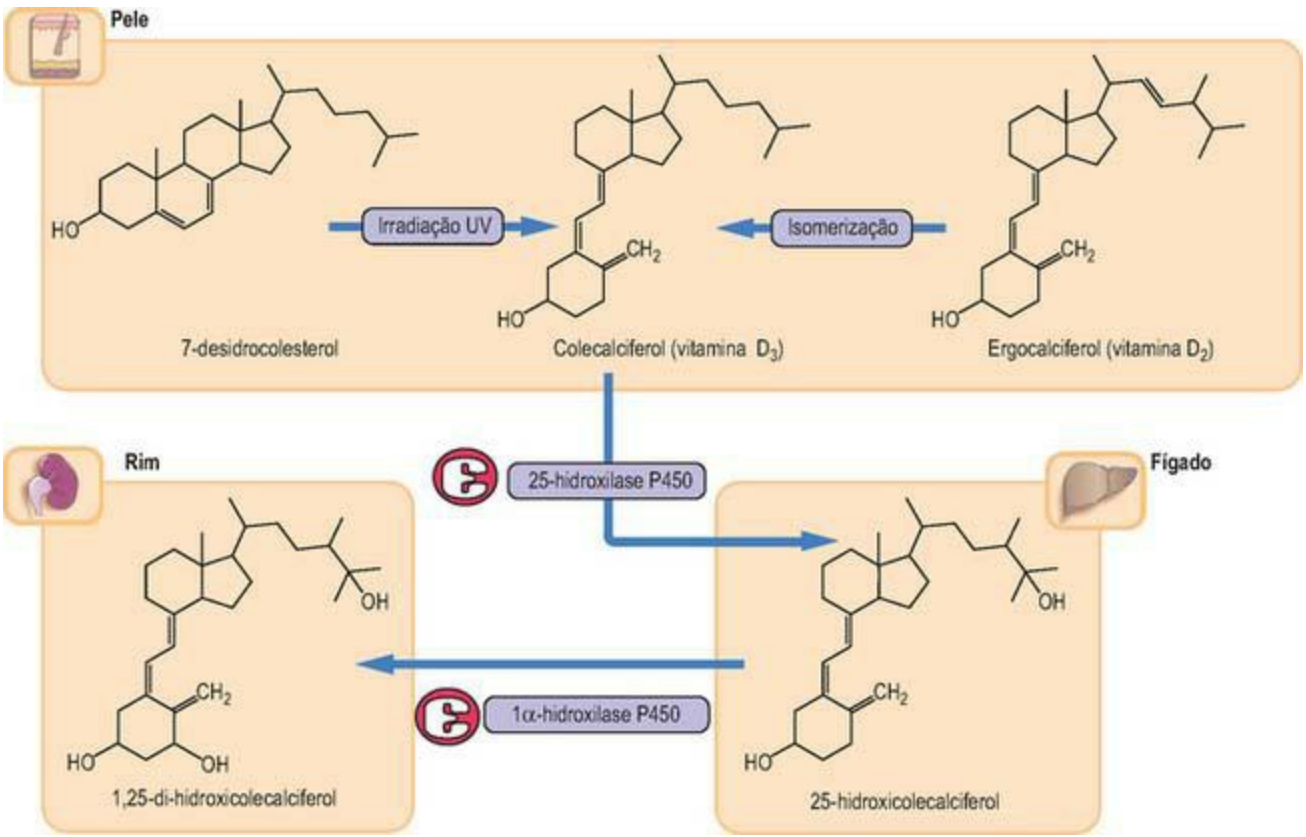


Fig. 25.5 O metabolismo da vitamina D. A vitamina D é principalmente sintetizada em resposta à ação da luz solar na pele; um componente menor é proveniente da dieta. O funcionamento normal do fígado e dos rins é essencial para a síntese da forma ativa 1,25 $(OH)_2D_3$. A concentração plasmática de cálcio controla os níveis de 1,25 $(OH)_2D_3$ pelo paratormônio. 1,25 $(OH)_2D_3$, 1,25-di-hidroxicolecalciferol, calcitriol.

O 25-hidroxicolecalciferol (25(OH)D_3) é a principal forma de armazenamento de vitamina D no fígado

A etapa de 25-hidroxilação é realizada por uma enzima microssomal hepática e é a etapa limitante da conversão da vitamina D_3 em seus metabólitos ativos. O conteúdo hepático de 25(OH)D_3 regula a taxa de 25-hidroxilação. A 25(OH)D_3, a principal forma de vitamina encontrada tanto no fígado quanto na circulação, encontra-se ligada à DBP e seus níveis na circulação refletem os estoques hepáticos desta vitamina. Uma proporção significativa de 25(OH)D_3 é submetida à circulação êntero-hepática, sendo excretada na bile e reabsorvida no intestino delgado. Qualquer distúrbio na circulação êntero-hepática pode levar a uma carência desta vitamina.

DOSAGEM DO PARATORMÔNIO

O $PTH_{(1-84)}$ intacto é a forma biologicamente ativa mais importante do PTH, e pode ser dosado por ensaios imunorradiométricos (IRMAs) específicos, sem a interferência de seus fragmentos amino- ou carboxiterminais. Estes ensaios utilizam a técnica de anticorpos duplos, sendo um anticorpo de captura direcionado contra uma das extremidades da molécula intacta, e um anticorpo de detecção marcado direcionado contra a extremidade oposta da molécula. Somente a forma íntegra do PTH, contendo 84 aminoácidos, é capaz de ligar-se aos dois anticorpos, o que significa que os fragmentos de PTH produzidos durante o seu metabolismo (Fig. 25.2) não são mensurados por estes ensaios.

O metabólito ativo da vitamina D é o 1α,25-di-hidro-xicolecalciferol ($1,25(OH)_2D_3$)

A $25(OH)D_3$ é hidroxilada na posição 1 por enzimas presentes principalmente nos túbulos renais, embora tal reação também possa ocorrer nos ossos e na placenta. A 1α-hidroxilase da $25(OH)D_3$ é uma enzima mitocondrial. O produto $1,25(OH)_2D_3$ (calcitriol) é o metabólito da vitamina D mais potente e a única forma natural ativa em concentrações fisiológicas. A atividade da 1α-hidroxilase é estimulada pelo PTH, por baixas concentrações de fosfato ou cálcio no soro, pela deficiência de vitamina D, pela calcitonina, pelo hormônio do crescimento, além da prolactina e do estrogênio. Por sua vez, a atividade da 1α-hidroxilase é inibida por *feedback* pela $1,25\ (OH)_2D_3$, pela hipercalcemia, por altas concentrações de fosfato e no hipoparatireoidismo.

Os túbulos renais, a cartilagem, o intestino e a placenta também contêm a 24-hidroxilase, produzindo o 24,25-di-hidroxicolecalciferol inativo ($24,25[OH]_2D_3$; 24(R)-hidroxicalcidiol). O nível de $24,25(OH)_2D_3$ na circulação está reciprocamente relacionado ao nível de $1,25(OH)_2D_3$.

A $1,25(OH)_2D_3$ também é transportada no plasma ligada à DBP. Por afetar o transporte e o metabolismo de Ca^{2+} à distância, a vitamina D pode ser descrita como um hormônio. Nas células do epitélio intestinal, esta vitamina liga-se a um receptor citoplasmático da mesma forma que outros hormônios esteroides (Caps. 17 e 34). Este complexo proteína-ligante é transportado para o núcleo onde a $1,25(OH)_2D_3$ induz a expressão gênica, afetando o metabolismo do cálcio.

A $1,25(OH)_2D_3$ aumenta as concentrações de fosfato e de cálcio no soro

A $1,25(OH)_2D_3$ aumenta a absorção de cálcio e fosfato pelo intestino via transporte ativo por meio de proteínas que se ligam ao cálcio. Juntamente com o PTH, a $1,25(OH)_2D_3$ estimula a reabsorção óssea pelos osteoclastos. Este efeito aumenta as concentrações de cálcio e fosfato no soro. Baixas concentrações de $1,25(OH)_2D_3$ causam uma mineralização anormal do osteoide recém-formado. Isto é resultado da baixa disponibilidade de cálcio e de fosfato, e da diminuição da função do osteoblasto, levando ao raquitismo (em bebês e crianças) ou à osteomalácia (em adultos).

PROTEÍNA RELACIONADA AO PARATORMÔNIO (PTHrP)

A PTHrP é sintetizada em três isoformas contendo 139, 141 e 173 aminoácidos, em consequência de um *splicing* diferencial alternativo do RNA. A PTHrP apresenta homologia na sequência aminoterminal com o PTH: oito, dos primeiros 13 aminoácidos são idênticos na PTHrP e no PTH;

três são idênticos dentro dos resíduos 14-34; e outros três são idênticos dentro dos resíduos 35-84. A ativação do receptor clássico de PTH ocorre através da porção amino-terminal do PTH e da PTHrP, e ambas apresentam uma estrutura secundária em α-hélice no domínio de ligação. Como resultado desta similaridade estrutural, a PTHrP apresenta muitas das ações biológicas do PTH.

Até o momento, poucas evidências sugerem que a PTHrP tenha um papel na homeostasia do cálcio em um adulto normal, mas em modelos animais esta proteína é importante na regulação da homeostase do cálcio fetal e no desenvolvimento esquelético. A deleção do gene da PTHrP resulta em anormalidades esqueléticas graves (heterozigotos), ou morte (homozigotos). A PTHrP tem um papel importante na etiologia da hipercalcemia associada à malignidade (HCM) (veja adiante). A PTHrP sofre modificações pós-traducionais, produzindo fragmentos com atividade biológica que ainda precisam ser caracterizados. As relações estruturais e funcionais da PTHrP, conforme entendidas atualmente, encontram-se resumidas na Figura 25.7.

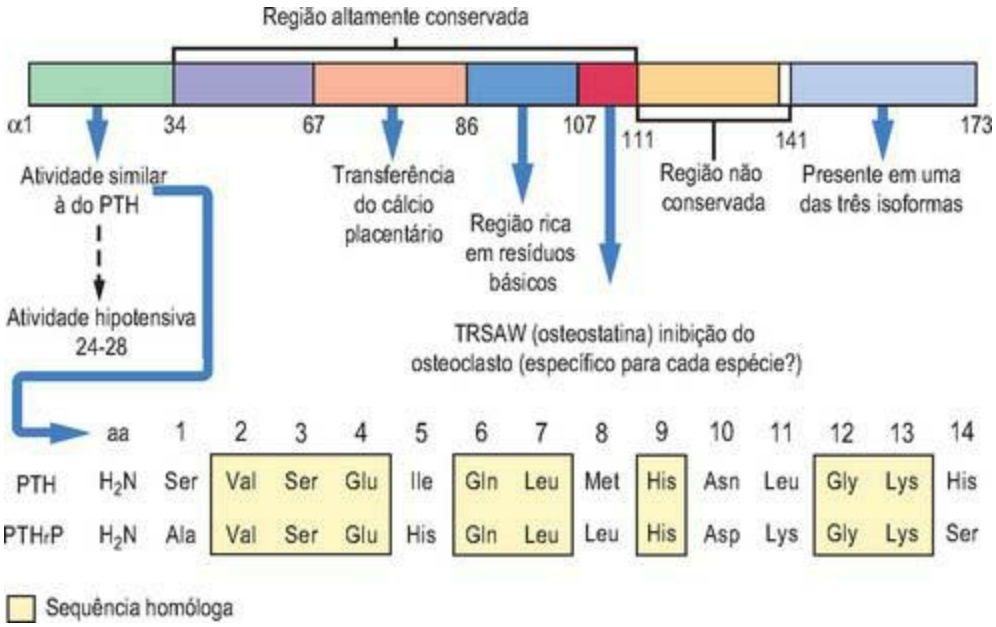


Fig. 25.7 Síntese da proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP), estrutura, e relações funcionais.

A calcitonina inibe a reabsorção óssea osteoclástica

A calcitonina é um peptídeo de 32 aminoácidos sintetizada e secretada principalmente pelas células parafoliculares da glândula tireoide (células C). Sua secreção é regulada de forma acurada pelo cálcio do soro por meio do receptor sensível ao cálcio (CaSR): um aumento dos níveis de cálcio no soro resulta em um aumento proporcional nos de calcitonina, assim como uma diminuição dos níveis de cálcio no soro provoca uma redução correspondente nos de calcitonina. A estimulação crônica ocasiona uma exaustão da reserva secretora das células C. O papel biológico preciso da calcitonina não é conhecido, mas o seu efeito principal é a inibição da reabsorção óssea pelos osteoclastos. Existe uma homologia significativa entre as espécies para a calcitonina, apresentando uma ponte dissulfeto 1-7 na porção aminoterminal, um resíduo de glicina na posição 28, e um resíduo amídico de prolina na porção carboxiterminal. As substituições de aminoácidos básicos aumentam a potência e, por isso, as calcitoninas produzidas pelo salmão e pela enguia aumentam a atividade biológica nos sistemas de mamíferos, se comparadas com aquelas da calcitonina endógena.

O cálcio é absorvido no intestino delgado e excretado nas fezes e na urina

O cálcio é absorvido predominantemente na parte proximal do intestino delgado; e é regulado pela quantidade de cálcio ingerida na dieta e por dois processos de transporte celular:

- Absorção transcelular saturável ativa estimulada pela 1,25 $(OH)_2D_3$

- Absorção paracelular não saturável controlada pela concentração de cálcio na luz intestinal em relação à sua concentração no soro.

Em um adulto normal em dieta ocidental, o equilíbrio do cálcio é mantido: a quantidade de cálcio ingerida e a sua deposição no osso correspondem exatamente à sua excreção nas fezes e na urina. Durante o crescimento, a criança pode apresentar um equilíbrio positivo de cálcio, enquanto indivíduos idosos ou que sofrem de alguma doença um equilíbrio negativo. O aumento ou a diminuição da absorção de cálcio é um reflexo de alterações no consumo de cálcio pela dieta, da solubilidade do cálcio no intestino e do metabolismo da vitamina D.

Normalmente, à medida que a concentração de cálcio no soro aumenta, sua excreção também aumenta. Na hipercalcemia causada por hiperparatireoidismo (HPT), o PTH promove a reabsorção do cálcio filtrado no túbulo renal. Isto diminui os efeitos da filtração intensa de cálcio e da inibição de sua reabsorção tubular renal, que ocorrem em resposta ao aumento da concentração deste mineral no soro. Por sua vez, a diminuição da concentração de cálcio no soro está associada à redução de sua excreção urinária, principalmente como um resultado da queda da quantidade de cálcio filtrado. Em pacientes com hipoparatireoidismo, que não secretam PTH, a reabsorção do cálcio pelo túbulo renal é reduzida.

Outros hormônios também afetam a homeostase do cálcio

Diversos hormônios afetam direta ou indiretamente a homeostase do cálcio e o metabolismo esquelético.

O hormônio da tireoide estimula a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos. Os esteroides adrenais ou gonadais, particularmente o estrogênio nas mulheres e a testosterona nos homens, têm efeitos regulatórios importantes, aumentando a função dos osteoblastos e diminuindo a dos osteoclastos. Eles também diminuem a excreção renal de cálcio e fosfato e a excreção de cálcio intestinal.

Os hormônios do crescimento tem efeitos anabólicos no osso, promovendo o crescimento do esqueleto. Acredita-se que estes efeitos sejam mediados por fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-1 e IGF-2) que atuam nas células de linhagem osteoblástica. O hormônio de crescimento aumenta a excreção urinária de cálcio e de hidroxiprolina, enquanto diminui a excreção urinária de fosfato.

DISTÚRBIOS DO METABOLISMO DO CÁLCIO E DO OSSO

Hipercalcemia

A hipercalcemia é frequentemente causada por hiperparatireoidismo primário ou por malignidade

Na prática, 90% dos casos ocorrem em virtude do HPT primário ou da malignidade; o maior desafio no diagnóstico é diferenciar a malignidade de sitio primário indeterminado das causas menos comuns da hipercalcemia (Tabela 25.2). Há uma grande variação individual no desenvolvimento dos sinais e sintomas da hipercalcemia (Fig. 25.6).

Tabela 25.2 Causas comuns e incomuns da hipercalcemia.

Causas da hipercalcemia	
Causas comuns	hiperparatireoidismo primário
	doença malígna
	iatrogênica – vitamina D ou seus análogos
Causas incomuns	tireotoxicose
	mieloma múltiplo
	sarcoidose
	induzida por drogas:
	diuréticos tiazídicos
	lítio
	insuficiênda renal (aguda e crônica)
	hipercalcemia hipocaldúrica familiar



Fig. 25.6 Sinais e sintomas da hipercalcemia. Os sintomas se tornam mais aparentes à medida que a concentração sérica de cálcio aumenta.

Investigação da hipercalcemia

Na maioria dos casos, a causa da hipercalcemia é identificada com a obtenção de um histórico clínico preciso, pelo exame clínico e por testes bioquímicos específicos. Em alguns casos, entretanto, valiosas informações adicionais a respeito da causa podem ser obtidas com investigações radiológicas e biópsias de tecido. O desenvolvimento e a rápida disponibilidade de ensaios específicos, sensíveis e confiáveis para dosar o PTH intacto capacitaram os médicos a distinguir mais facilmente o HPT primário das causas de hipercalcemia de origem não paratireoidea (particularmente a maligna). Na hipercalcemia do HPT primário observa-se um aumento ou uma deteção inapropriada de PTH intacto, enquanto na hipercalcemia de origem não paratireoidea os níveis de PTH intacto se encontram frequentemente abaixo do limite de detecção do ensaio.

Vários testes laboratoriais podem ser necessários para diferenciar as causas não paratireoideas da hipercalcemia

Em uma alta porcentagem dos casos, a hipercalcemia associada à malignidade é causada por tumores que secretam a proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP) (Fig. 25.7; quadro da pág. 342). O histórico do paciente pode apresentar claras evidências de ingestão excessiva ou superdosagem de vitamina D, mas algumas vezes só se torna aparente após a dosagem de vitamina D_3 (colecalciferol), D_2 (ergocalciferol) e 1,25 $(OH)_2D_3$. As medições de eletrólitos, ureia e creatinina no soro podem confirmar uma insuficiência renal; a avaliação das proteínas, da albumina e das imunoglobulinas pode indicar a presença de um mieloma (Cap. 4), que deve ser investigado por eletroforese do soro e da urina. Os testes de função da tireoide (dosagem do hormônio tireoestimulante, da tiroxina total e da tri-iodotironina total) ou a estimativa dos hormônios tireoideos livres (Cap. 39) permitem o diagnóstico da hipercalcemia tireotóxica. As causas raras da hipercalcemia podem ser diagnosticadas pela estimativa do nível de lítio (toxicidade ou superdosagem), do hormônio do crescimento (acromegalia), da vitamina A (toxicidade) e das catecolaminas na urina (feocromocitoma, Cap. 42).

O hiperparatireoidismo (HPT) primário é relativamente comum

O HPT primário é um distúrbio endócrino relativamente comum, caracterizado pela hipercalcemia associada a aumento ou concentração inapropriados de PTH intacto. Sua incidência na população varia de 1:500 a 1:1.000. Em 80-85% dos pacientes, encontra-se um único adenoma na glândula paratireoide, uma condição curável com a remoção bem-sucedida do adenoma.

A hipercalcemia associada à malignidade (HCM)

A hipercalcemia tende a ocorrer tardiamente no curso de doenças malignas, e é geralmente um mau sinal de prognóstico. Um tratamento efetivo e relativamente inofensivo para a HCM já está disponível, e pode melhorar significantemente a qualidade de vida destes pacientes, aliviando os sintomas da hipercalcemia.

O tratamento da hipercalcemia pode melhorar consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes

A hipercalcemia sintomática ou concentrações de cálcio no soro que excedam 3,0 mmol/L (12 mg/dL) podem ser dignas de tratamento. A desidratação ocorre em função da poliúria induzida pela hipercalcemia, da diminuição da ingestão de líquidos e de alimentos associada a vômitos, da diminuição da atividade vasopressora da arginina (AVP, Cap. 23) no túbulo distal, e da redução da perfusão renal. A reposição de líquido corrige a hipovolemia e fornece uma carga moderada de sódio, ocasionando um aumento concomitante da excreção de cálcio. Os bisfosfonatos (Fig. 25.8) têm melhorado o tratamento da HCM, e são as drogas disponíveis mais efetivas para o tratamento da hipercalcemia. Este grupo de drogas apresenta seus principais efeitos ao inibirem a atividade dos osteoclastos imediatamente após sua infusão, e exercem um efeito mais prolongado ao serem incorporados na matriz óssea em uma posição normalmente ocupada pelo pirofosfato. A calcitonina também inibe diretamente a atividade dos osteoclastos e diminui a reabsorção de cálcio nos túbulos renais. Subsequentemente, ocorre uma redução do número de receptores de calcitonina, fazendo com que o efeito hipocalcêmico dure apenas de quatro a cinco dias.

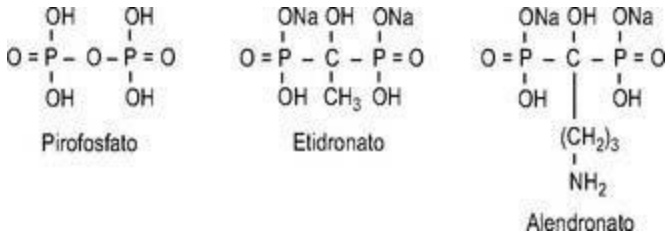


Fig. 25.8 Fórmulas estruturais do pirofosfato e dos bifosfonatos. As ligações P-C-P dos bifosfonatos podem resistir à clivagem enzimática, e a potência destas drogas é determinada pela sequência química ligada à molécula de carbono.

HIPERPARATIREOIDISMO (HPT) PRIMÁRIO

Uma senhora de 52 anos de idade apresentou-se no setor de emergência do hospital local de sua cidade sofrendo de muita dor nas costelas do lado direito do corpo. Detectou-se sangue no exame de urina e a radiografia revelou a presença de pedras nos rins. A dor foi controlada com analgesia opioide. Uma investigação mais aprofundada revelou histórico de depressão recente, fraqueza generalizada, indigestão recorrente e dores em ambas as mãos. A concentração de cálcio corrigido no soro foi de 3,2 mmol/L (12,8 mg/dL; faixa normal: 2,2- 2,6 mmol/L, 8,8-10,4 mg/dL), de fosfato sérico 0,65 mmol/L (2,0 mg/dL; faixa normal: 0,7-1,4 mmol/L, 2,2-5,6 mg/dL) e de PTH 16,9 pmol/L (169 pg/mL; faixa normal: 1,1-6,9 pmol/L, 11-69 pg/mL).

Comentário. A maioria dos pacientes com HPT primário é agora identificada quando a

hipercalcemia assintomática é descoberta em testes bioquímicos de rotina ou durante a investigação de sintomas inespecíficos. Quando sintomático, o HPT primário clássico afeta o esqueleto, os rins e o trato gastrointestinal, resultando em uma tríade de queixas bem-conhecida, descrita como "ossos, pedras e roncos abdominais". As queixas mais comuns são aquelas relacionadas à presença de pedras nos rins.

Os dois principais mecanismos da HCM são conhecidos

A reabsorção de cálcio pelo rim encontra-se frequentemente aumentada na HCM, interferindo na capacidade dos rins em limitar a liberação acentuada de cálcio no soro, um resultado do aumento da atividade dos osteoclastos. Existem duas fontes principais de estimulação dos osteoclastos:

- um fator humoral circulante secretado por tumor
- um ou mais fatores ativos que são produzidos e secretados no local por tumores ou por metástases no osso

Estudos recentes indicam que a causa mais comum para a HCM é a produção, por tumores ou suas metástases, de PTHrP (veja anteriormente), que pode circular no sangue e manifestar seus efeitos no esqueleto e nos rins. A produção de PTHrP é comum nos tumores sólidos de mama, de pulmão, de rim e outros, mas é mais rara nas malignidades hematológicas, gastrointestinais, de cabeça e de pescoço. A porção aminoterminal da PTHrP possui atividade similar ao PTH, resultando em hipercalcemia, hipofosfatemia, fosfatúria, aumento da reabsorção renal de cálcio e ativação dos osteoclastos.

O segundo tipo de hipercalcemia é resultado de um aumento da reabsorção óssea por osteoclastos estimulados pelos fatores produzidos por tumores primários ou, mais usualmente, pelas metástases. Estes fatores estimulam os osteoclastos alterando o equilíbrio RANKL/OPG. Mediadores como a PTHrP, as citocinas e os fatores de crescimento (p. ex., IL-1, TNF-α, linfotoxina, e TFG-α) estimulam os osteoclastos aumentando a reabsorção óssea significativamente. A produção de prostaglandinas, especialmente aquelas da série E (PGE_2), ocorre em diversas classes de tumores, particularmente no câncer de mama. Elas estimulam a reabsorção óssea pelos osteoclastos, e em altas concentrações podem levar à hipercalcemia.

O excesso de vitamina D é tóxico

O aumento do uso terapêutico de potentes análogos da vitamina D, hidroxilados na posição 1 ou nas posições 1 e 25, fazem da toxicidade da vitamina D a terceira causa mais comum de hipercalcemia.

É importante ajustar a concentração de cálcio sérico para a concentração de albumina

Diversas enfermidades agudas e crônicas levam a uma diminuição da concentração de albumina no soro, que, por sua vez, diminui a concentração de cálcio sérico total. É importante que o cálcio corrigido no soro seja calculado em situações clínicas. Concentrações abaixo dos níveis de referência (< 2,20 mmol/L; 8,8 mg/dL) podem ocorrer frequentemente na prática clínica. As alterações do cálcio ionizado podem ser resultado de mudanças de pH do plasma, particularmente a alcalemia (Cap. 24). Esta aumenta a concentração de Ca^{2+} ligado a proteínas, causando a diminuição da concentração do cálcio ionizado.



HIPOCALCEMIA NO RECÉM-NASCIDO

Uma parteira da comunidade notou que um recém-nascido não prematuro, saudável, do gênero masculino, com sete dias de idade e pesando 3,5 Kg era inquieto e tinha uma alimentação pobre em casa. Em uma visita ao pediatra, o cálcio no sangue foi dosado e apresentou um valor de 1,55 mmol/L (6,2 mg/dL). A criança respondeu a suplementação de cálcio e à vitamina D.

Comentário. A hipocalcemia pós-natal é comum, apresentando na maioria das vezes níveis de cálcio acima de 1,75 mmol/L. Nas primeiras 36 horas de vida, a concentração de cálcio cai no recém-nascido, pois os níveis de cálcio da mãe são relativamente maiores e inativam a paratireoide fetal. Após dois dias, as concentrações aumentam novamente.

Quando ocorre uma queda mais profunda nos níveis de cálcio no recém-nascido, e particularmente quando ela acontece no final da primeira semana de vida, outras causas podem ser encontradas. As possibilidades incluem o hipoparatireodismo primário, o hiperparatireoidismo materno com hipercalcemia, e a deficiência materna de vitamina D. Assim, são necessárias investigações do recém-nascido e da mãe.

Os sinais clínicos da hipocalcemia são, principalmente, devido à irritabilidade neuromuscular, e são mais óbvios e graves quando o início da hipocalcemia é agudo. Em alguns casos, esta irritabilidade pode ser demonstrada pela produção de sinais clínicos específicos. O sinal de Chvostek é a presença de tremores na musculatura ao redor da boca (músculos periorais) em resposta à percussão do nervo facial anterior a orelha. O sinal de Trousseau é a típica contração da mão em resposta a uma redução do fluxo sanguíneo nos braços ocasionado pela insuflação de um aparelho de pressão. Perda de sensibilidade, formigamento, câimbra, tétano e a epilepsia podem ser estimulados pela hipocalcemia.

A hipocalcemia pode ser devido a baixas concentrações de PTH, ao hiperparatireoidismo secundário ou à resistência tecidual ao PTH

A hipocalcemia pode ser devido a uma baixa concentração de $PTH_{(1-84)}$, a um HPT secundário resultante de uma diminuição dos níveis de cálcio sérico e raramente a uma resistência ao PTH (Tabela 25.3). O desenvolvimento da hipocalcemia indica que os mecanismos compensatórios fisiológicos controlados pelo PTH falharam e que existe um distúrbio no fluxo de cálcio entre os ossos, rins e intestino.

Tabela 25.3 Causas da hipocalcemia.

Causas da hipocalcemia		
Hipoparatireoide	**Não paratireoidea**	**Resistência ao PTH**
pós-operatório	deficiência de vitamina D	pseudo-hipoparatireoidismo
idiopática	má absorção	hipomagnesemia
hipomagnesemia adquirida	doença hepática	
irradiação cervical	doença renal	
terapia anticonvulsivante	resistênda à vitamina D hipofosfatemia	

Hipoparatireoidismo

As causas mais comuns do hipoparatireoidismo ocorrem em função de complicações em cirurgias de pescoço, particularmente nas de tumores de faringe ou laringe, doenças da tireoide ou doenças da paratireoide.

Pseudo-hipoparatireoidismo

O grupo das síndromes do pseudo-hipoparatireoidismo (PHP) é caracterizado por hipocalcemia, hiperfosfatemia e aumento das concentrações de $PTH_{(1-84)}$ (acentuadamente elevada em alguns pacientes).

O tipo clássico de PHP é devido à resistência do órgão ao PTH. Isto ocorre em função de um defeito genético, resultando na síntese de uma subunidade regulatória anormal da proteína G do complexo adenilato ciclase. A confirmação do diagnóstico é feita pela observação dos níveis de cAMP no plasma e na urina após a infusão de PTH. O resultado é positivo para a doença quando após a infusão tais níveis não aumentam.

Metabolismo anormal de vitamina D

A hipocalcemia resultante de anormalidades no metabolismo da vitamina D pode ser devido a uma carência, a desordens adquiridas ou herdadas do metabolismo, e à resistência a esta vitamina.

Além disso, a insensibilidade tecidual à 1,25 $(OH)_2D_3$ resulta nos achados característicos da hipocalcemia, do HPT secundário e do aumento dos níveis de 1,25 $(OH)_2D_3$. Individualmente ou em combinação, as causas mais comuns da carência de vitamina D são:

- **Baixa exposição à luz solar:** esta é comum em pessoas idosas institucionalizadas e imigrantes a Europa ocidental, vindas do Oriente Médio ou do subcontinente indiano, que vestem roupas tradicionais

- **Ingestão de uma dieta pobre em vitamina D:** a maioria das dietas ocidentais contém quantidade suficiente de vitamina D, porém dietas como a dos vegetarianos restritos ou a dos lactovegetarianos possuem uma quantidade inadequada desta vitamina que, a longo prazo, pode resultar em uma carência.

- **Má absorção** de vitamina D pode ser causada por doença celíaca, doença de Crohn, insuficiência pancreática, secreção inadequada de sal biliar e sprue não tropical (Cap. 10).

O MAGNÉSIO NO HIPOPARATIREOIDISMO

Pacientes que apresentam baixa concentração plasmática de magnésio desenvolvem um estado funcional de hipoparatireoidismo e resistência do órgão ao PTH; estes pacientes tendem a não responder ao tratamento apenas com a suplementação de cálcio. A secreção de PTH da glândula paratireoide requer uma quantidade mínima de magnésio para permitir a fusão dos grânulos secretores com a membrana, e a liberação do PTH (Fig. 25.4). Desta forma, a fim de restaurar a função normal da glândula paratireoide e a normocalcemia, a suplementação de magnésio é essencial.

As anormalidades do metabolismo da vitamina D são observadas, entre outras, em pacientes com doenças no fígado (deficiência de 25-hidroxilação, má absorção) e insuficiência renal

(deficiência de 1α-hidroxilase).

DOENÇA METABÓLICA ÓSSEA

A osteoporose é uma doença óssea comum relacionada à idade

A osteoporose pode ser definida como uma redução significativa da densidade mineral óssea em relação aos índices compatíveis com o sexo e a idade, o que leva ao aumento da suscetibilidade a fraturas. A osteoporose está associada ao envelhecimento, e com o aumento da longevidade, uma porcentagem significativa da população se tornará suscetível a esta doença e suas sequelas. A densidade óssea diminui a partir do seu pico máximo, alcançado por volta dos 30 anos de idade nos homens e nas mulheres, e a taxa de perda óssea é acelerada nas mulheres após a perda da secreção de estrogênio na menopausa. A perda óssea progressiva que acontece com o envelhecimento é um resultado do desacoplamento do *turnover* ósseo por um período de tempo muito prolongado, com um relativo aumento da reabsorção ou decréscimo da absorção óssea. Vários fatores contribuem para um aumento do risco de osteoporose (Fig. 25.9). Setenta milhões de pessoas em todo mundo correm o risco de desenvolverem osteoporose.

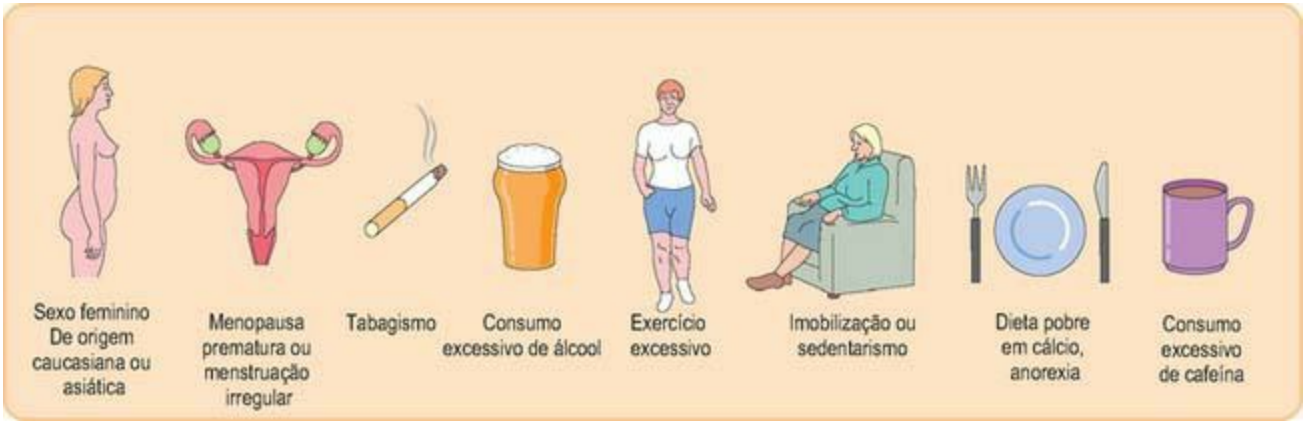


Fig. 25.9 Fatores de risco e causas secundárias da osteoporose.

Existem muitos debates sobre as melhores abordagens terapêuticas para a osteoporose, e várias questões têm sido levantadas sobre a possibilidade de detectar os "rápidos perdedores ósseos" pela dosagem de marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. A maioria dos tratamentos disponíveis diminui a atividade osteoclástica e são, portanto, antirreabsortivos. Porém, novas terapias estão disponíveis, como as injeções subcutâneas noturnas de $PTH_{(1\text{-}34)}$ que possuem uma função anabólica, estimulando a atividade dos osteoblastos e a formação óssea.

A doença de Paget dos ossos é um distúrbio caracterizado por áreas de turnover ósseo acelerado, iniciado por um aumento da reabsorção óssea mediada por osteoclastos

Os osteoclastos na doença de Paget são grandes, numerosos e multinucleados (até 100 núcleos); suas atividades estão associadas ao aumento do número e da atividade dos osteoblastos. Uma anormalidade bioquímica comum a esta doença é a alta atividade de fosfatase alcalina, a qual reflete aumento da atividade dos osteoblastos. A intensa quebra do colágeno pelos osteoclastos resulta em altas concentrações de hidroxiprolina, piridinolinas e telopeptídeos no soro e na urina. Os bifosfonatos (Fig. 25.8) apresentam uma atividade antiosteoclástica significativa, e são as drogas de primeira escolha para o tratamento da doença de Paget.

Osteomalácia

A característica patológica da osteomalácia é o defeito da mineralização do osteoide no osso maduro. Quando isso ocorre no esqueleto em crescimento, há também a perda da maturação e da mineralização de células cartilaginosas na placa de crescimento; o termo raquitismo é usado para descrever os achados clínicos, radiológicos e patológicos observados em crianças. Existem diversas causas da osteomalácia, muitas delas relacionadas às anormalidades do metabolismo da vitamina D.

TRATAMENTO DA DOENÇA DO METABOLISMO ÓSSEO

O estrogênio tem um papel essencial na manutenção da massa óssea nas mulheres. Um aumento na taxa de perda óssea mediada por osteoclastos é observado imediatamente após a menopausa como um resultado da falência ovariana e da diminuição da secreção de estrogênio. Isto pode ser prevenido pela terapia de reposição hormonal (HRT), a qual pode ser administrada de forma cíclica ou contínua, associada ao estrogênio e à progesterona em mulheres com o útero intacto, ou somente ao estrogênio em mulheres que tiveram seus úteros removido cirurgicamente (por histerectomia). Testes da Women's Health Initiative (WHI) observaram um excesso de efeitos adversos, incluindo o aumento da incidência de câncer de mama, de doença tromboembolítica, de acidente vascular encefálico e de eventos cardiovasculares em mulheres que receberam HRT combinada de forma contínua por mais de cinco anos. Embora as terapias de curta duração sejam válidas para os sintomas da menopausa, o uso prolongado da HRT não é mais recomendado como profilaxia ou tratamento da osteoporose.

Outros tratamentos recomendados são: os bifosfonatos, os moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs), as injeções noturnas de PTH, a calcitonina e, em pacientes idosos, o cálcio com suplementação de vitamina D.

OSTEOPOROSE: UMA SENHORA COM INTENSA DOR NAS COSTAS

Uma senhora de 62 anos de idade foi admitida no hospital com uma intensa dor nas costas que surgiu repentinamente entre as escápulas após uma queda no banheiro. A radiografia detectou fraturas em cunha no corpo de duas vértebras torácicas com redução da densidade óssea. Um exame de densitometria óssea ou absortometria de energia dupla de raios X (DEXA) mostrou uma redução intensa da densidade óssea do fêmur e da espinha dorsal. Esta senhora entrou na menopausa após uma cirurgia de histerectomia aos 41 anos de idade, porém, tinha sido incapaz de tolerar a terapia de reposição hormonal (HRT). As investigações bioquímicas estavam todas dentro dos limites normais.

Comentário. Os sintomas da osteoporose desenvolvem-se em um estágio tardio da doença e são geralmente causados pela presença de fratura(s). As fraturas no quadril, nas vértebras e no punho são comuns em pacientes com osteoporose, e resultam em mortalidade e morbidade significativas. A HRT pode ser usada para prevenir o desenvolvimento da perda óssea em mulheres pós-menopausa, porém aumenta suavemente o risco de acidente vascular encefálico, ataque cardíaco e câncer de mama.

OSTEOMALÁCIA: UMA SENHORA COM FRAQUEZA GENERALIZADA E DIFICULDADE DE CAMINHAR

Uma senhora de 60 anos de idade que havia se tornado cada vez mais fraca e acamada foi encaminhada ao ambulatório de doenças metabólicas. Ela havia passado por um início gradual de dores difusas por todo o corpo, mas especialmente ao redor do quadril. Esta senhora estava com dificuldade de caminhar, fraqueza generalizada e recentemente apresentava dores intensas repentinas em suas costelas e na pelve. A radiografia detectou fraturas nas costelas. A concentração de cálcio corrigido no soro foi de 2,1 mmol/L (8,4 mg/L); faixa normal: 2,2-2,6 mmol/L, 8,8-10,4 mg/dL), a de fosfato 0,56 mmol/L (1,7 mg/dL; faixa normal: 0,7-1,4 mmol/L, 2,2-4,3 mg/dL), a atividade de fosfatase alcalina foi de 300 IU/L (faixa normal: 50-260 IU/L) e a concentração de PTH foi de 12,6 pmol/L (faixa normal: 1,1-6,9 pmol/L, 11-69 pg/mL).

Comentário. Nas formas graves da osteomalácia, as anormalidades bioquímicas são frequentemente observadas, incluindo baixos níveis de cálcio corrigido e fosfato no soro, e aumento da atividade de fosfatase alcalina e da concentração de $PTH_{(1-84)}$. Clinicamente, o paciente pode apresentar dores ósseas difusas ou dores mais específicas relacionadas a fraturas, arqueamento lateral dos membros inferiores e uma distinta marcha claudicante. Grupos étnicos de pele negra são particularmente suscetíveis em países com baixa luminosidade solar média, já que a maioria da vitamina D do corpo é formada pelo uso ação da luz UV no 7-desidrocolesterol. Isto pode ser exacerbado para vestimentas tradicionais, e uma dieta rica em fitato (pães não fermentados) e pobre em cálcio e vitamina D.

Resumo

- O osso é um tecido metabolicamente ativo que passa por remodelamento constante.
- As principais células envolvidas no processo de remodelamento são os osteoclastos e os osteoblastos.
- O metabolismo ósseo está intimamente correlacionado com o metabolismo do cálcio, o qual também envolve o intestino e o rim.
- Um receptor sensível ao cálcio presente nas células paratireóideas, tireóideas e renais é essencial na regulação do cálcio.
- O equilíbrio do cálcio é regulado hormonalmente pelo paratormônio, pelos metabólitos da vitamina D e pela calcitonina.
- A medição do cálcio no soro é um importante teste em laboratórios clínicos porque tanto a hipercalcemia quanto a hipocalcemia levam a sintomas clínicos.
- As principais causas da hipercalcemia são o hiperparatireoidismo primário, malignidade e o excesso de vitamina D.
- A osteoporose é um grave problema de saúde e é caracterizada pela diminuição da densidade óssea, ocasionando fraturas.

O SISTEMA NERVOSO CENTRAL PODE ESTAR ENVOLVIDO NA REGULAÇÃO DO METABOLISMO ÓSSEO

Estudos recentes sugerem que o sistema nervoso central também pode estar envolvido na homeostase óssea. A leptina, uma adipocina que regula a massa do tecido adiposo e controla o apetite (Cap. 22), apresenta um efeito inibitório na formação do osso. Animais deficientes em leptina mostram um aumento da massa óssea. Entretanto, mutações na via de sinalização estimulada pela leptina não apresentam efeito na massa óssea, sugerindo que é um efeito central mediado provavelmente pelo sistema nervoso simpático.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Descreva o sistema de sinalização de RANK-RANKL nos osteoclastos.

2. Discuta os fatores que regulam o funcionamento dos osteoblastos.

3. Descreva as formas presentes do cálcio no plasma. Qual delas é biologicamente ativa?

4. Discuta os mecanismos de *feedback* que mantêm a concentração de cálcio no plasma.

Leituras sugeridas

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423:337-341.

Buckley KA, Fraser WD. Receptor activator for nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegrin: regulators of bone physiology and immune responses/potential therapeutic agents and biochemical markers. *Ann Clin Biochem.* 2002;39:551-556.

MJ Favus, editor. Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2003.

Fraser WD. Paget's disease of bone. *CPD Rheumatology*. 2001;2:8-13.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003;423:349-355.

Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 2003;423:332-336.

Richards JB, Rivadeneira F, TM Pastinen, et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet*. 2008;371:1505-1512.

Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. *Lancet*. 2006;367:2010-2018.

Carboidratos Complexos: Glicoproteínas

A.D. Elbein

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever as estruturas gerais dos oligossacarídeos em vários tipos de glicoproteínas.
- Escrever a sequência de reações envolvidas na biossíntese e processamento de oligossacarídeos *N*-ligados para produzir os vários tipos de cadeias de oligossacarídeos.
- Descrever o papel dos oligossacarídeos *N*-ligados no enovelamento e estabilidade das proteínas, e reconhecimento célula-célula.
- Explicar a importância dos oligossacarídeos *O*-ligados na função da mucina.
- Descrever como cada monossacarídeo, envolvido na biossíntese de oligossacarídeos *N*-ligados e *O*-ligados, é sintetizado da glicose e ativado para a síntese de glicoconjugados.
- Distinguir lectinas de outros tipos de proteínas e descrever seu papel na fisiologia e patologia.
- Descrever diversas doenças que estão associadas a deficiências em enzimas envolvidas na síntese, modificação ou degradação de carboidratos complexos.

INTRODUÇÃO

Muitas proteínas de mamíferos são glicoproteínas, isto é, contêm açúcares covalentemente ligados a aminoácidos específicos em sua estrutura. Existem dois tipos principais de proteínas que contêm açúcares que ocorrem em células animais, geralmente conhecidos como glicoproteínas e proteoglicanos. Juntamente com os glicolipídeos, os quais são apresentados no próximo capítulo, todos esses compostos fazem parte de um grupo de macromoléculas que contém açúcares chamado glicoconjugado.

As glicoproteínas (Fig. 26.1) possuem cadeias glicadas curtas: podem ter até 20 açúcares, mas geralmente contêm entre três e 15 açúcares. Esses oligossacarídeos são altamente ramificados, não têm uma unidade de repetição, e geralmente contêm açúcares aminados (*N*-acetilglicosamina ou *N*-acetilgalactosamina), açúcares neutros (D-galactose, D-manose, L-fucose) e o açúcar ácido: ácido siálico (ácido *N*-acetilneurâmico). Em geral, as glicoproteínas não contêm ácidos urônicos, açúcares ácidos que constituem importante parte dos proteoglicanos. As glicoproteínas geralmente contêm quantidades muito menores de carboidratos do que de proteínas, tipicamente de pequenos percentuais de carboidratos, a 10%-15% de açúcar por peso.

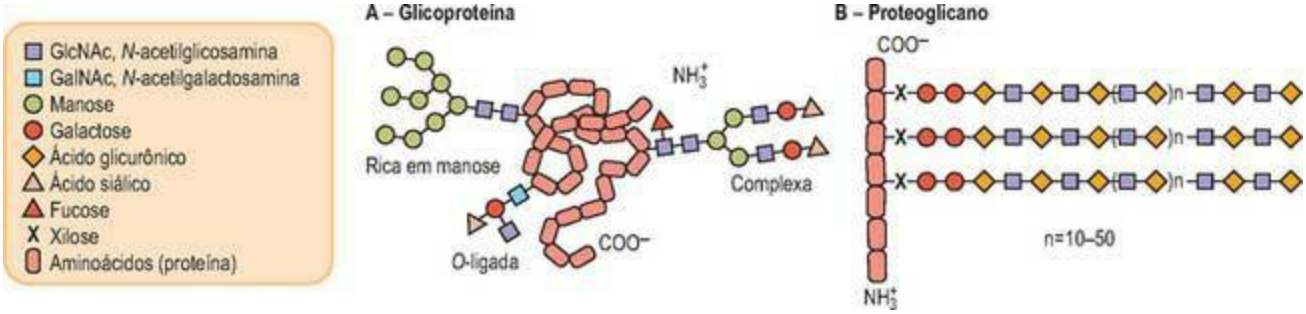


Fig. 26.1 Modelo generalizado da estrutura de glicoproteínas e proteoglicanos.

Os proteoglicanos (Fig. 26.1 e Cap. 28) contêm cerca de 50%-60% de carboidratos. Nessas moléculas, as cadeias de açúcares são longas, polímeros não ramificados que podem conter centenas de monossacarídeos. Essas cadeias de sacarídeos possuem uma unidade dissacarídica de repetição, em geral composta de um ácido urônico e um açúcar aminado.

A maioria das proteínas de membrana da superfície celular, que funcionam como receptores para hormônios ou participam de outros processos importantes associados à membrana, como as interações célula-célula, são glicoproteínas. Muitas das proteínas de membrana do retículo endoplasmático ou aparelho de Golgi, bem como as proteínas que são secretadas pelas células, incluindo proteínas mucosas e séricas, também são glicoproteínas. De fato, a glicosilação é a principal modificação enzimática das proteínas no corpo. A adição de açúcares a uma proteína pode ocorrer ao mesmo tempo e na mesma localização enquanto a síntese de proteínas está ocorrendo no retículo endoplasmático, isto é, cotraducionalmente, ou após o término da síntese proteica e após a proteína ter sido transportada para o aparelho de Golgi, ou seja, pós-traducionalmente. As funções das cadeias de carboidratos das glicoproteínas resultantes são diversas (Tabela 26.1).

Tabela 26.1 Função dos carboidratos nas glicoproteínas.

Função dos carboidratos nas glicoproteínas
■auxilia o enovelamento da proteína na conformação correta ■aumenta a solubilidade da proteína ■estabiliza a proteína contra desnaturação ■protege a proteína da degradação proteolítica ■diredona a proteína para localizações subcelulares específicas ■serve como sinal de reconhedmento para proteínas ligantes de carboidratos (lectinas)

ESTRUTURAS E LIGAÇÕES

Os açúcares são unidos a aminoácidos específicos nas proteí-nas

Os açúcares podem ser ligados às proteínas por ligações *N*-glicosídicas ou *O*-glicosídicas. Os oligossacarídeos tipo *N*-glicosídicos são largamente distribuídos na natureza e são característicos de proteínas de membrana e secretadas. A ligação desses oligossacarídeos à proteína envolve uma ligação glicosilamina entre um resíduo de *N*-acetilglicosamina (GlclNAc) e o nitrogênio amida de um resíduo de asparagina (Fig. 26.2A). A asparagina, que serve como um aceptor deste oligossacarídeo, deve estar na sequência consenso Asn-X-Ser (Thr) para ser reconhecida como aceptor pela enzima que transfere o oligossacarídeo (a seguir). Entretanto, nem todos os resíduos de asparagina, mesmo aqueles da sequência consenso tornam-se glicosilados, indicando que outros fatores como a conformação ou outras propriedades da proteína podem estar envolvidos.

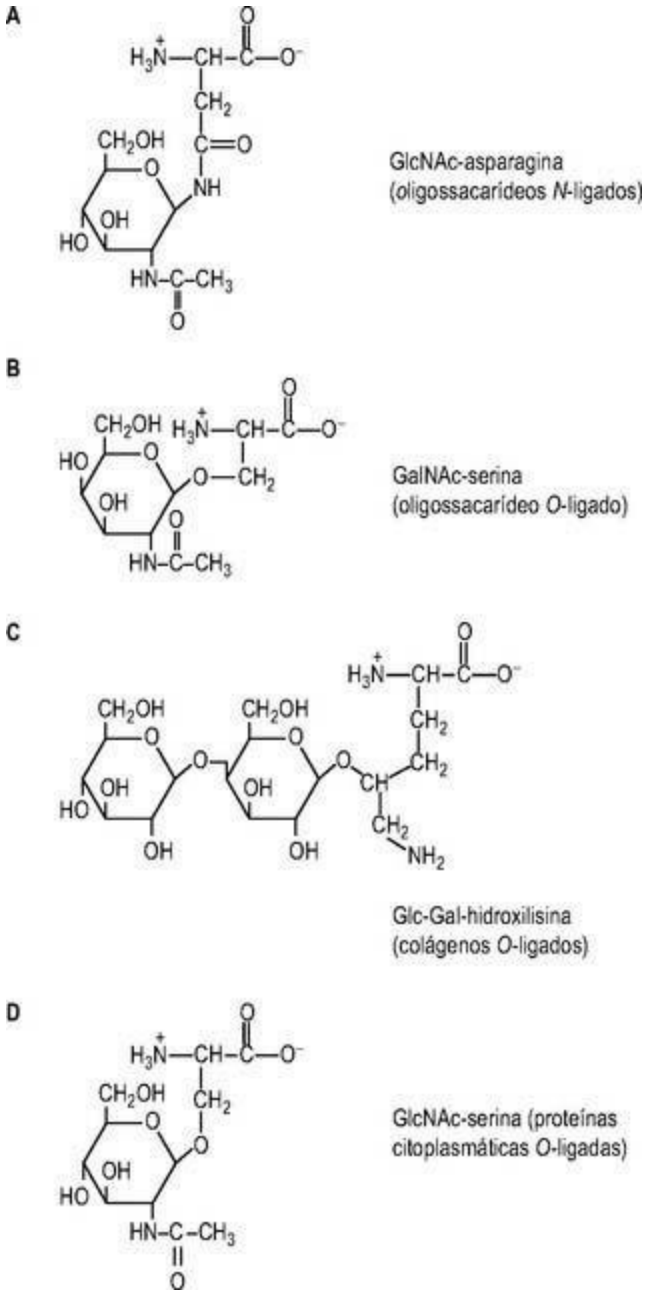


Fig. 26.2 Várias ligações de açúcares a aminoácidos nas glicoproteínas. GlcNAc, *N*-acetilglicosamina.

Os oligossacarídeos *O*-ligados são os mais encontrados nas proteínas de fluidos mucosos, mas também ocorrem frequentemente nas mesmas proteínas de membrana e secretadas que contêm os oligossacarídeos *N*-ligados. As cadeias *O*-ligadas contêm tipicamente três ou mais açúcares em cadeia linear ou ramificada, unidos à proteína por uma ligação glicosídica entre um resíduo de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), e um grupamento hidroxil de um resíduo de serina ou treonina da proteína (Fig. 26.2B; e Fig. 26.4). Não parece haver uma sequência consenso de aminoácidos para glicosilação *O*-ligada, desta forma, não se sabe como algumas serinas (ou treoninas) tornam-se glicosiladas e outras não.

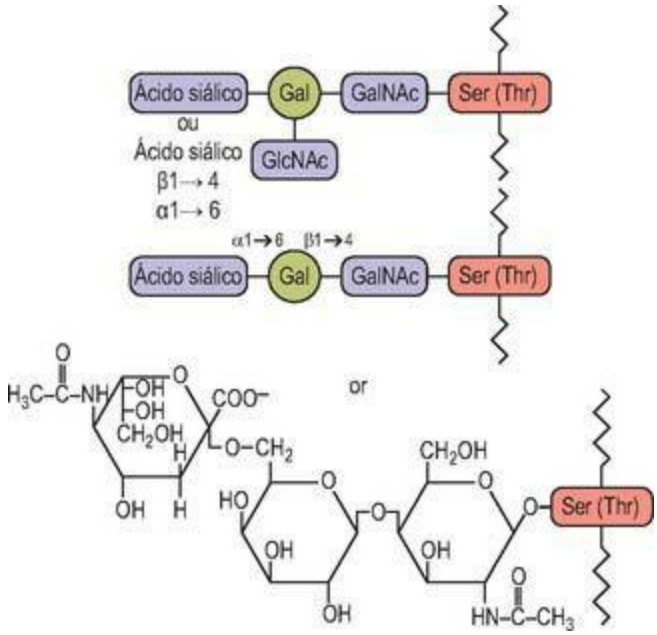


Fig. 26.4 Estruturas típicas de oligossacarídeos *O*-ligados.

Um dissacarídeo glicosil-galactose está frequentemente ligado ao grupo hidroxila de resíduos de hidroxilisina nas proteínas fibrosas, como o colágeno (Fig. 26.2C). A hidroxilisina é um aminoácido incomum, encontrado somente em colágenos e proteínas com domínios colagenosos. A hidroxilisina não é incorporada diretamente nas proteínas, mas é produzida por hidroxilação pós-traducional dos resíduos de lisina. A lisina hidroxilase requer a vitamina C como um cofator, o que explica porque a vitamina C é frequentemente usada para acelerar a cicatrização de lesões. O colágeno é inicialmente sintetizado na célula como uma forma precursora chamada pró-colágeno. Os pró-colágenos geralmente são sintetizados como glicoproteínas *N*-ligadas, mas o oligossacarídeo *N*-ligado é removido como parte daquele peptídeo que é clivado do pró-colágeno durante sua maturação para colágeno. Somente os dissacarídeos *O*-ligados permanecem na molécula de colágeno madura. Os colágenos menos glicosilados tendem a formar estruturas ordenadas fibrosas, assim como ocorre nos tendões, enquanto os colágenos abundantemente glicosilados são encontrados em estruturas em rede, como as membranas basais da parede vascular e do glomérulo renal (Cap. 28).

Um único GlcNAc é encontrado ligado ao grupo hidroxila de serinas em diversas proteínas citoplasmáticas (Fig. 26.2D). O GlcNAc é ligado a resíduos de serina específicos que normalmente tornam-se fosforilados por proteínas quinases durante estimulação hormonal ou outros eventos de

sinalização. A enzima que adiciona o GlcNAc é largamente distribuída, mas como é controlada ainda não está claro. Existe uma segunda enzima que remove o GlcNAc das serinas, semelhante ao contrastante papel regulatório das proteínas quinases e fosfatases. A adição do GlcNAc pode representar um mecanismo que permite às células bloquearem a fosforilação de resíduos específicos de serina em proteínas selecionadas, enquanto permite que outros sejam fosforilados. Então, o GlcNAc pode ser removido sob condições apropriadas para permitir a fosforilação.

Outro aminoácido que pode servir como local para glicosilação é a tirosina. O único exemplo dessa ligação é na proteína glicogenina, encontrada no centro do glicogênio (Cap. 13). A glicogenina é uma proteína autoglicosilante que inicialmente liga uma glicose ao grupo hidroxila de um dos seus resíduos de tirosina. A proteína então adiciona várias outras glicoses à glicose ligada à proteína para fazer um oligossacarídeo que serve como aceptor para a glicogênio sintase.

Oligossacarídeos N-ligados ou têm "muita manose" ou estruturas "complexas" construídas sobre uma estrutura central comum

Embora exista um grande número de diferentes estruturas de carboidratos produzidas por células vivas, a maioria dos oligossacarídeos nos glicoconjugados tem muitos açúcares e ligações glicosídicas em comum. Todas as glicoproteínas *N*-ligadas têm cadeias de oligossacarídeos que são estruturas ramificadas tendo um centro comum de três resíduos de manose e dois resíduos de GlcNAc (Fig. 26.3A e B), mas diferem consideravelmente além da região central podendo formar cadeias do tipo rica em manose ou complexas. A razão para essa similaridade na estrutura é que o tipo de oligossacarídeo *N*-ligado tipo rico em manose é o precursor biossintético para todos os outros oligossacarídeos *N*-ligados. Como indicado a seguir (Fig. 26.10), o oligossacarídeo é inicialmente formado em um carreador lipídico no retículo endoplasmático como uma estrutura rica em manose, e então é transferido para a proteína. Ele pode permanecer como uma estrutura rica em manose, especialmente em organismos inferiores, mas nos animais os oligossacarídeos sofrem uma série de processamentos no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi que envolve a remoção de algumas manoses e a adição de outros açúcares. Como resultado, além da região central, os oligossacarídeos dão origem a uma variedade de estruturas conhecidas como ricas em manose (Fig. 26.3A), e cadeias complexas (Fig. 26.3B).

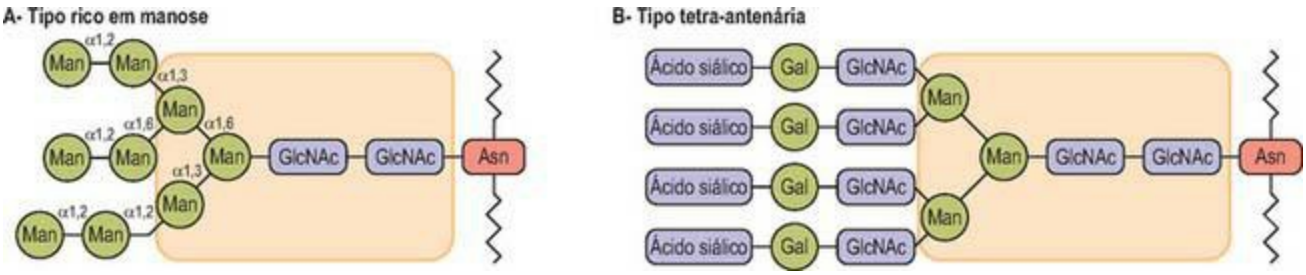


Fig. 26.3 Estruturas típicas ricas em manose e complexas, oligossacarídeos *N*-ligados. A estrutura central (área sombreada) é comum a ambas as estruturas. Asn, asparagina; Gal, galactose; Man, manose.

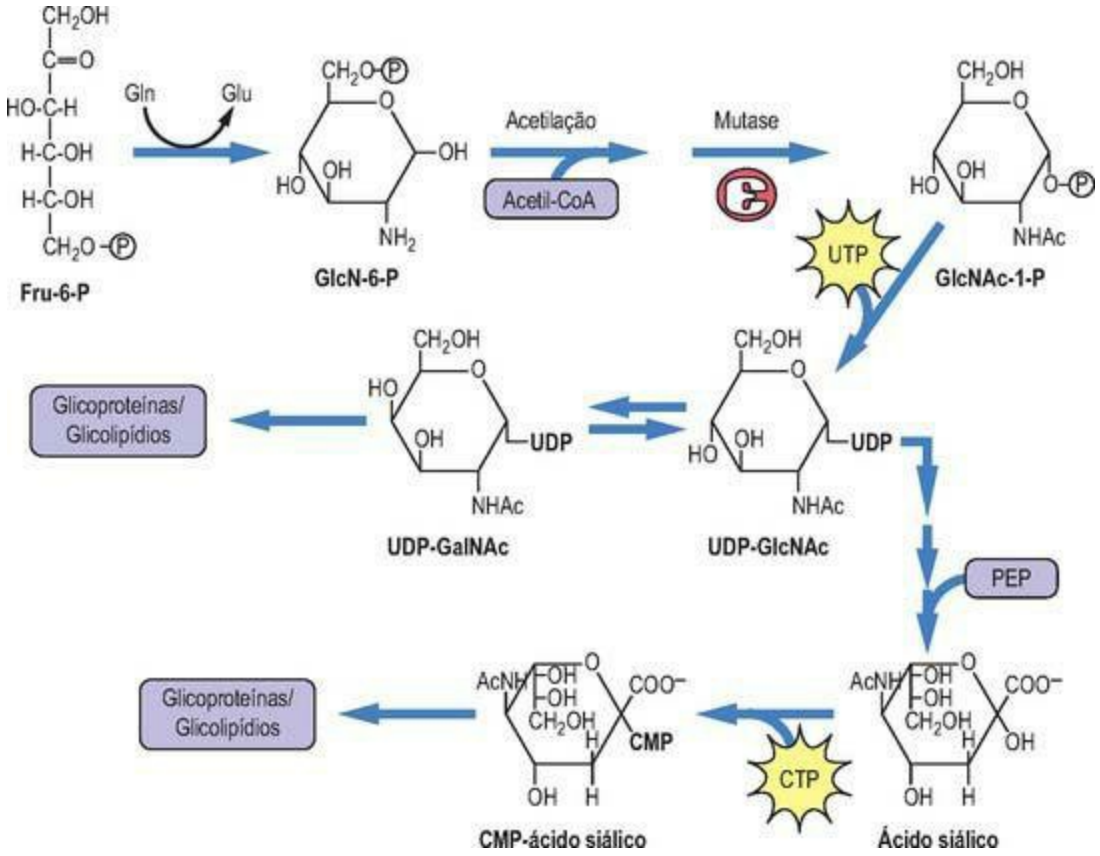


Fig. 26.10 Síntese de açúcares aminados e ácido siálico. Acetil-CoA, acetil coenzima A; GlcN-6-P, glicosamina-6-fosfato; GlcNAc-6-P, *N*-acetilglicosamina-6-fosfato; GalNAc, acetilgalactosamina; HNAc, AcHN, grupamento acetamida; PEP, fosfoenolpiruvato.

Os oligossacarídeos complexos são assim denominados devidos à sua composição de açúcar mais complexa, incluindo galactose, ácido siálico e L-fucose. As cadeias complexas têm sequências trissacarídicas terminais compostas de ácido siálico-galactose-GlcNAc presas a cada manose do oligossacarídeo ramificado central (Fig. 26.3A). A L-fucose também pode ser encontrada ligada ao GlcNAc central (Fig. 26.1A) ou no lugar do ácido siálico nas sequências trissacarídicas terminais. Semelhante ao ácido siálico, a fucose é geralmente um açúcar terminal nos oligossacarídeos; o que significa que nenhum outro açúcar está ligado a ela. Alguns dos oligossacarídeos complexos têm duas sequências de trissacarídeos, ligadas à cada manose do oligossacarídeo ramificado central sendo, portanto, chamados de cadeias complexas biantenárias; enquanto que outros têm três (triantenárias) ou quatro (tetra-antenárias) das estruturas trissacarídicas (Fig. 26.3B). Mais de 100 estruturas diferentes de oligossacarídeos complexos foram identificadas em várias proteínas de superfície celular, proporcionando grande diversidade como mediadores de reconhecimento celular e eventos de sinalização química.

Estruturas gerais das glicoproteínas

Uma glicoproteína pode ter uma única cadeia de oligossacarídeo *N*-ligada ou pode ter vários desse tipo de oligossacarídeo. Além disso, os oligossacarídeos *N*-ligados podem todos ter estruturas idênticas ou podem ser bastante diferentes. Por exemplo, as glicoproteínas da capa do vírus influenza, hemaglutinina e neuraminidase, são ambas glicoproteínas *N*-ligadas as quais geralmente têm sete cadeias de oligossacarídeos *N*-ligados, das quais cinco são cadeias complexas biantenárias e duas são estruturas ricas em manose. Assim, é comum encontrar várias estruturas relacionadas numa única glicoproteína e, de fato, múltiplas estruturas diferentes podem ser encontradas em um único local na glicoproteína. A micro-heterogeneidade das estruturas oligossacarídicas resulta do processamento incompleto de algumas cadeias durante sua biossíntese (Fig. 26.11). Como resultado, alguns dos oligossacarídeos numa glicoproteína podem ser cadeias complexas completas enquanto outros podem ter sido processados somente parcialmente. Os oligossacarídeos mais próximos da porção amino terminal são os mais altamente processados, talvez porque sejam os primeiros a ser adicionados à proteína, enquanto aqueles próximos da porção carboxi terminal são mais prováveis de ser oligossacarídeos ricos em manose. Entretanto, outros fatores como a conformação das proteínas também deve ser importantes, desde que alguns oligossacarídeos ricos em manose não sofram processamento independente das condições.

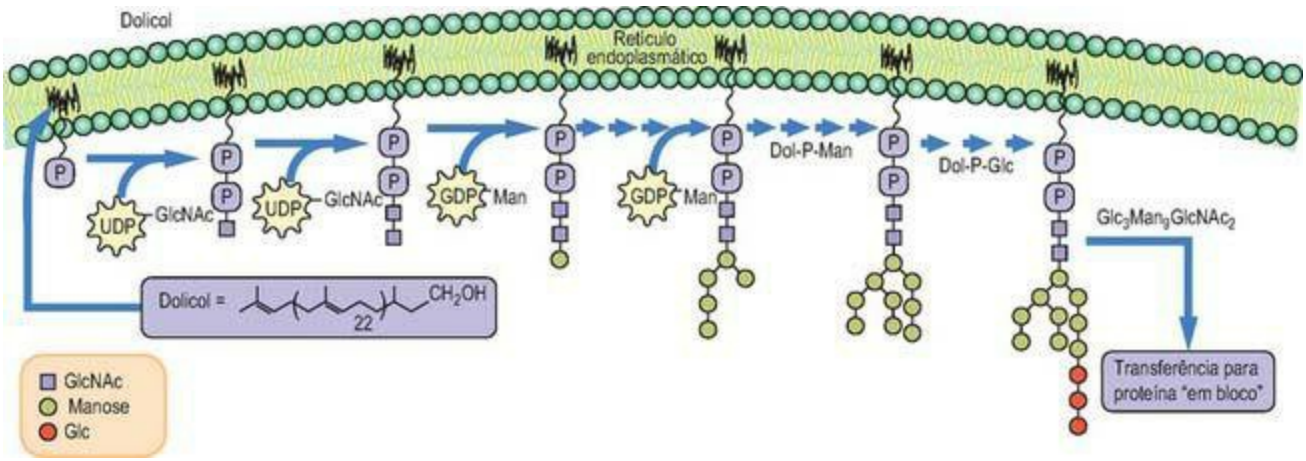


Fig. 26.11 **Síntese de oligossacarídeos *N*-ligados no retículo endoplasmático.** GlcNAc, acetilglicosamina; Dol, dolicol; Man, manose.

Muitas glicoproteínas *N*-ligadas também contêm oligossacarídeos *O*-ligados do tipo mostrado na Figura 26.4. O número de oligossacarídeos *O*-ligados varia consideravelmente dependendo da proteína e sua função. Por exemplo, o receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL) está presente na membrana plasmática de células musculares lisas e fibroblastos, e funciona para ligar e endocitar o LDL circulante, como fonte de esterol dietético. O receptor de LDL tem dois oligossacarídeos *N*-ligados localizados próximo ao domínio ligante de LDL, e um conjunto de oligossacarídeos *O*-ligados próximo à região que atravessa a membrana. Como mostrado na Figura 26.5, esse receptor tem uma região de aminoácidos hidrofóbicos que atravessa a membrana, uma região estendida de aminoácidos no lado externo da membrana plasmática que contém um conjunto de oligossacarídeos *O*-ligados, e um domínio funcional que está envolvido na ligação ao LDL (Cap. 18).

Embora as duas cadeias *N*-ligadas estejam próximas ao domínio funcional, elas não atuam na ligação ao LDL. Em vez disso, sua função parece ser de ajudar a proteína a se dobrar em sua conformação apropriada no retículo endoplasmático de modo que possa ser translocada para o aparelho de Golgi. Acredita-se que a função das cadeias *O*-ligadas carregadas negativamente, contendo cada uma um ácido siálico, seja manter a proteína em um estado estendido, e impedir que ela volte a se dobrar.

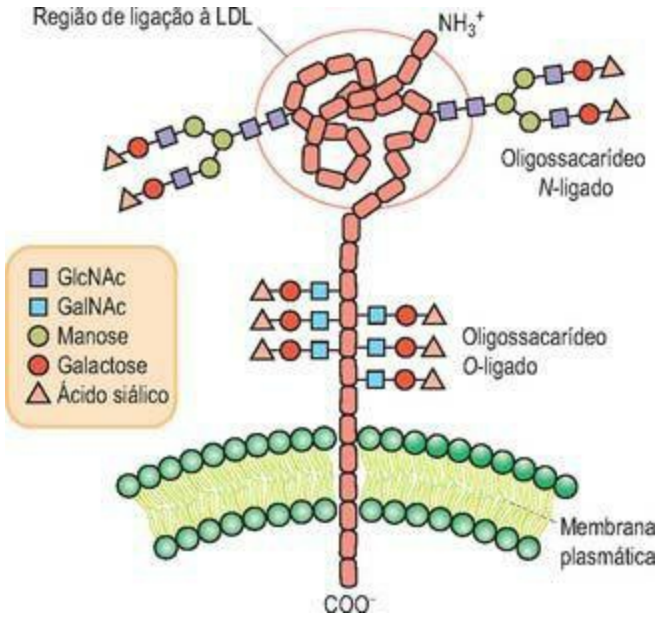


Fig. 26.5 Modelo do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL). (Veja também o capítulo 18 e compare com a Figura 18.2).

A ESTRUTURA DOS OLIGOSSACARÍDEOS *N*-LIGADOS DEPENDE DAS ENZIMAS QUE A CÉLULA POSSUI

A estrutura final da cadeia de oligossacarídeos *N*-ligados de uma dada glicoproteína não é codificada nos genes destas proteínas, mas depende do conteúdo de enzimas da célula que faz aqueles oligossacarídeos. Todas as células parecem ter as enzimas necessárias para produzir o sacarídeo ligado ao lipídio precursor das cadeias *N*-ligadas ricas em manose, e podem, portanto, glicosilar qualquer proteína de membrana que tenha uma asparagina apropriada na sequência e conformação proteica correta. Entretanto, as glicosiltransferases e glicosidases envolvidas em processar os oligossacarídeos à sua estrutura complexa final não são largamente distribuídas, e uma dada glicosiltransferase pode estar presente em um tipo celular mas não em outro. Por exemplo, um tipo celular pode ter a GlcNAc transferase (GlcNAc TIII) necessária para ligar um segundo GlcNAc na manose-2 para fazer uma cadeia complexa triantenária, enquanto outra célula pode não ter essa GlcNAc transferase ou a outra para fazer a cadeia tetra-antenária. Tal célula fará somente cadeias biantenárias. Vírus envelopados, tais como o vírus da influenza ou o HIV, são exemplos desse fenômeno, desde que as estruturas de seus oligossacarídeos *N*-ligados reflitam a célula na qual eles crescem; os vírus usam a maquinaria celular para fazerem todas as suas estruturas, e portanto suas glicoproteínas terão as mesmas estruturas de carboidratos que as células infectadas. Para os vírus, isso é vantajoso, visto que suas proteínas não serão reconhecidas como proteínas estranhas e

escaparão da vigilância do sistema imune. Além disso, isso permite que vírus se liguem aos receptores da célula hospedeira e se fusionem com as membranas da mesma célula hospedeira, interagindo com as lectinas do hospedeiro. Na indústria de biotecnologia, isso significa que, embora uma dada proteína tenha sequências de aminoácidos idênticas independente do tipo celular, ela terá diferentes estruturas de oligossacarídeos, dependendo da célula na qual ela for expressa. Essas diferenças nas estruturas dos carboidratos podem afetar a conformação e as propriedades funcionais da proteína e limitar o seu uso em terapias de reposição de proteínas ou enzimas. De fato, muitas células usadas para expressar proteínas "humanas" são construídas por bioengenharia para conterem o conjunto de enzimas necessárias para glicosilar apropriadamente a proteína-alvo.

Relação função-estrutura nas glicoproteínas mucinas

As mucinas são glicoproteínas secretadas pelas células epiteliais de revestimento dos tratos respiratório, gastrointestinal e genitourinário. Essas proteínas são muito grandes em tamanho, com subunidades de peso molecular superior a um milhão de daltons, e tendo quase 80% do seu peso de carboidratos. As mucinas são desenhadas unicamente para sua função, com cerca de um terço de aminoácidos sendo serinas ou treoninas, e a maioria desses sendo modificados com oligossacarídeos O-ligados. Devido à maioria dos oligossacarídeos carregarem um ácido siálico negativamente carregado e essas cargas negativas estarem bem próximas, elas repelem umas às outras e impedem a proteína de se enovelar, fazendo com que ela permaneça em seu estado estendido. Assim, a solução de proteína é altamente viscosa, formando uma barreira protetora na superfície epitelial, promovendo lubrificação entre as superfícies e facilitando os processos de transporte, como o movimento do alimento através do sistema gastrointestinal. Existe uma ampla variedade de complexas estruturas oligossacarídicas lineares e ramificadas nas mucinas, incluindo antígenos de grupos sanguíneos (Cap. 27). Alguns oligossacarídeos participam da interação e ligação a várias superfícies de células bacterianas. Essa propriedade pode ter um papel significante no sequestro e eliminação de bactérias, limitando sua colonização e infecção.

INTERCONVERSÕES DOS AÇÚCARES DA DIETA

Células normais podem usar a glicose para fazer todos os açúcares que elas precisam

Os humanos têm uma necessidade dietética para alguns ácidos graxos e aminoácidos essenciais, e vitaminas (Cap. 11), mas todos os açúcares que eles necessitam para fazer glicoconjugados podem ser sintetizados do açúcar sanguíneo, isto é, D-glicose. A Figura 26.6 apresenta uma visão geral das sequências de reações envolvidas na interconversão de açúcares em células de mamíferos. Todas essas reações de interconversões de açúcares envolvem açúcares fosfatos ou açúcares nucleotídeos.

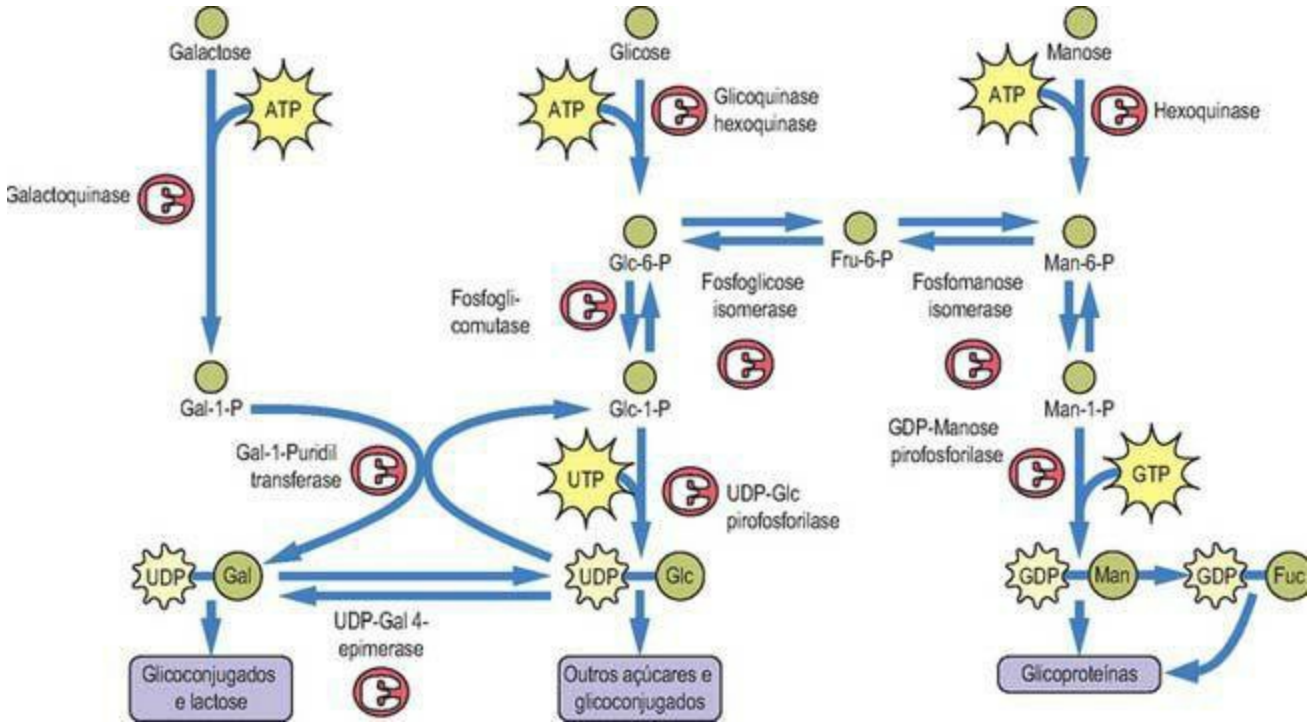


Fig. 26.6 Interconversões de glicose, manose, galactose e seus açúcares nucleotídeos. Fuc, fucose; Gal-1-P, galactose-1-fosfato; Glc-1-P, glicose-1-fosfato; Man-1-P, manose-1-fosfato.

Formação de galactose, manose e fucose a partir da glicose

A glicose é fosforilada pela hexoquinase (ou glicoquinase no fígado) assim que entra na célula. A glicose-6-fosfato (Glc-6-P) pode então ser convertida por uma mutase (fosfoglicomutase) para formar Glc-1-P, a qual reage com uridina 5′-trifosfato (UTP) para formar UDP-Glc, catalisado pela enzima UDP-Glc pirofosforilase. Essa enzima é uma pirofosforilase, denominada para uma reação reversa na qual o fosfato da Glc-1-P atua clivando a ligação pirofosfato da UTP para formar UDP-Glc e pirofosfato (PPi); a clivagem do PPi pela pirofosfatase promove o impulso para a reação. Essa é a mesma via usada no fígado e no músculo para incorporação da glicose em glicogênio. A UDP-Glc é epimerizada à UDP-galactose (UDP-Gal) pela UDP-Gal 4-epimerase, promovendo UDP-Gal para síntese de glicoconjugados.

A Glc-6-P também pode ser convertida em frutose-6-fosfato (Fru-6-P) pela enzima glicolítica fosfoglicose isomerase, e a Fru-6-P pode ser isomerizada à manose-6-fosfato (Man-6-P) pela fosfomanose isomerase. A Man-6-P é então convertida pela mutase (fosfomanose mutase) em Man-1-P, a qual condensa com o GTP para formar GDP-Man. A GDP-Man é a forma da manose que é usada na formação de oligossacarídeos *N*-ligados e é também a precursora para a formação de fucose ativada, GDP-$_{L}$-fucose. A manose está presente em nossa dieta em pequenas quantidades, mas ela não é um componente essencial da dieta, desde que ela pode ser rapidamente produzida da glicose. Entretanto, a manose dietética pode ser fosforilada pela hexoquinase à Man-6-P, e então entrar no metabolismo por meio da fosfomanose isomerase.

Metabolismo da galactose

Embora as células animais normais possam fazer toda a galactose que precisam a partir da glicose, a galactose ainda é um importante componente de nossa dieta porque é um dos açúcares que compõem o dissacarídeo do leite, a lactose. A via do metabolismo da galactose requer três enzimas (Fig. 26.6). A galactose da dieta é transportada para o fígado onde é fosforilada por uma quinase específica, a galactoquinase, que liga um fosfato ao grupo hidroxila no carbono 1, em vez do carbono-6, para formar galactose-1-fosfato (Gal-1-P). Os humanos são deficientes em UDP-Gal pirofosforilase, de modo que a conversão da Gal-1-P em Glc-1-P envolve a participação de um açúcar nucleotídeo, UDP-Glc. A enzima Gal-1-P uridiltransferase catalisa uma troca entre UDP-Glc e Gal-1-P para formar UDP-Gal e Glc-1-P (Fig. 26.6). A Glc-1-P surgida do metabolismo da galactose pode ser convertida em Glc-6-P pela fosfoglicomutase, e assim a molécula original de galactose entra na glicólise.

A UDP-Glc está presente nas células somente em concentrações micromolares, assim a sua disponibildade para o metabolismo da galactose poderia ser rapidamente exaurida se não fosse pela presença de uma terceira enzima, a UDP-Gal-4-epimerase. Essa enzima catalisa o equilíbrio entre UDP-Glc e UDP-Gal, promovendo uma síntese constante de UDP-Glc durante o metabolismo da galactose. As reações catalisadas pela (1) galactoquinase; (2) Gal-1-P-uridiltransferase; e (3) UDP-Gal-4-epimerase estão resumidas a seguir, ilustrando as vias indiretas pelas quais a galactose passa a ser incorporada às vias metabólicas.

(1) Gal + ATP → Gal-1-P + ADP

(2) Gal-1-P + UDP-Glc → Glc-1-P + UDP-Gal

(3) UDP-Gal → UDP-Glc

Soma: Gal + ATP → Glc-1-P + ADP

Metabolismo da frutose

Outro açúcar comum na dieta é a frutose, que é um componente do dissacarídeo sacarose, ou açúcar de mesa. A frutose pode ser metabolizada nas células por duas vias, como mostrado na Figura 26.7. A frutose pode ser fosforilada pela hexoquinase, uma enzima que está presente em todas as células; entretanto, a hexoquinase tem uma forte preferência pela glicose como substrato, e a glicose, que está presente em concentrações em torno de 5 mmol/L no sangue, é um forte inibidor competitivo da fosforilação da frutose. A via primária de metabolismo da frutose, que é especialmente importante no fígado após as refeições, envolve a enzima frutoquinase. Essa enzima é uma quinase muito específica que fosforila a frutose no carbono-1 (em vez da posição 6 como a hexoquinase) para formar frutose-1-fosfato (Fru-1-P). A aldolase do fígado é chamada aldolase B, que tem especificidade de substrato diferente da aldolase A do músculo, porque a aldolase B pode clivar ambas Fru-1-P e Fru-1-6-P_2, enquanto a aldolase A cliva somente Fru-1,6-P_2. Assim, no fígado, os produtos da clivagem da frutose são di-idroxiacetona-fosfato e gliceraldeído (e não gliceraldeído-3-P). O gliceraldeído precisa então ser fosforilado pela triose quinase para que seja metabolizado na glicólise.

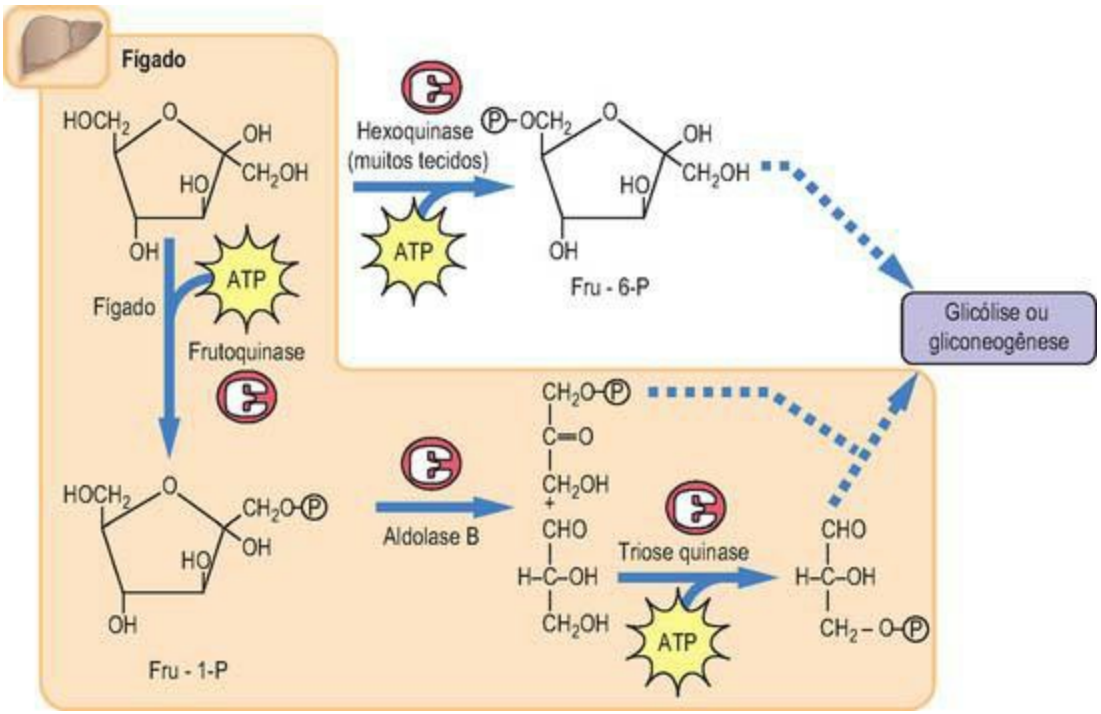


Fig. 26.7 Metabolismo da frutose pela frutoquinase ou hexoquinase.

Deve ficar claro que no fígado a frutose entra na glicólise no nível de intermediários da triose fosfato, em vez de Fru-6-P como no músculo. Assim, no fígado, a frutose ingerida não é submetida à regulação pelos pontos de controle comuns para as enzimas regulatórias, hexoquinase e fosfofrutoquinase. Por burlar esses dois passos limitantes, a frutose consiste numa rápida fonte de energia para ambas as células, aeróbicas e anaeróbicas. Isto é parte da base para o desenvolvimento de bebidas ricas em frutose como o Gatorade®. A importância da frutoquinase, em oposição à hexoquinase, na via do metabolismo da frutose é indicada pela patologia de intolerância hereditária à frutose (quadro clínico da pág. 358).

BIOSSÍNTESE DA LACTOSE

Lactose sintase e α-lactoalbumina

A lactose (galactosil-α1,4-glicose) é sintetizada da UDP-Gal e glicose nas glândulas de mamíferos durante a lactação. A lactose sintase é formada pela ligação da α-lactoalbumina à galactosil transferase, que normalmente participa na biossíntese de glicoproteínas *N*-ligadas. A α-lactoalbumina, expressa somente nas glândulas de mamíferos durante a lactação, converte a galactosil transferase em lactose sintase por diminuir o K_m da enzima para glicose na ordem de grandeza de três, de 1 mol/L para 1 mmol/L, levando à síntese preferencial de lactose. A α-lactoalbumina é o único exemplo conhecido de uma proteína "específica", que altera a especificidade de substrato de uma enzima.

GALACTOSEMIA: UMA CRIANÇA QUE DESENVOLVEU ICTERÍCIA APÓS ALIMENTAR-SE DE LEITE MATERNO

Um recém-nascido aparentemente normal começou a vomitar e desenvolve diarreia após ingerir leite materno. Esses problemas, e a desidratação, continuaram por vários dias, quando a criança começou a recusar alimento e desenvolver icterícia indicativa de lesão no fígado, seguidas por hepatomegalia e opacificação do cristalino (cataratas). A dosagem de glicose no sangue pelo ensaio da glicose oxidada (Cap. 3) indicou que a concentração de glicose estava baixa, compatível com falha na absorção de nutrientes. Entretanto, a glicose dosada pelo método colorimétrico, que mede o açúcar redutor total (isto é, qualquer açúcar capaz de reduzir o cobre), indicou que a concentração de açúcar estava bastante alta, tanto no sangue quanto na urina. O açúcar redutor acumulado foi identificado por fim como galactose, indicando uma anormalidade no metabolismo da galactose conhecida como galactosemia. Esses achados foram consistentes com a observação de que, quando o leite foi removido da dieta e substituído com uma fórmula infantil contendo sacarose em vez de lactose, o vômito e a diarreia pararam, e a função hepática melhorou gradativamente.

Comentário. O acúmulo de galactose no sangue na maioria das vezes é resultado de uma deficiência na enzima Gal-1-P uridil transferase (forma clássica da galactosemia), a qual evita e conversão da galactose à glicose e leva ao acúmulo de Gal e Gal-1-P nos tecidos. O acúmulo de Gal-1-P interfere com o metabolismo do fosfato e da glicose, levando à disseminação da lesão tecidual, falência de órgãos e retardo mental. Além disso, o acúmulo de galactose nos tecidos resulta na conversão de galactose, através da via poliol, à galactiol, a qual resulta no cristalino ocular um estresse osmótico e desenvolvimento de cataratas (comparar com catarata do diabético, Cap. 21). Outra forma de galacatosemia é causada por deficiência de galactoquinase, mas nesse caso a Gal-1-P não se acumula e as complicações são mais brandas.

INTOLERÂNCIA HEREDITÁRIA À FRUTOSE: UMA CRIANÇA QUE DESENVOLVEU

HIPOGLICEMIA APÓS COMER FRUTA

Uma criança foi levada à sala de emergência sofrendo de náuseas, vômitos e sintomas de hipoglicemia juntamente com sudorese, tontura e tremedeira. Os pais indicaram que esses ataques ocorrem logo após a ingestão de frutas (frutose) ou balas (açúcar de cana). Como resultado desses sintomas, a criança foi desenvolvendo uma forte aversão a frutas, então a mãe passou a fornecer uma grande suplementação com preparações multivitamínicas. A criança tinha peso abaixo do normal, mas não exibia qualquer um dos sintomas anteriores durante o período de tempo que foi alimentada no peito. Uma série de exames clínicos demonstrou certa cirrose no fígado, e um teste de tolerância à glicose normal. Entretanto, substâncias redutoras foram detectadas na urina, e estas substâncias redutoras não reagiram no teste da glicose oxidase (isto é, não são devido à glicose). O teste de tolerância à frutose foi realizado usando 3 g de frutose/m^2 de área de superfície corporal, dados intravenosamente em uma única e rápida injeção. Dentro de 30 minutos, a criança apresentou sintomas de hipoglicemia. A glicose sanguínea confirmou isso e revelou que a hipoglicemia foi maior após 60-90 minutos. As concentrações de glicose alcançaram um máximo (3,3 mmol/L) após 15 minutos e diminuíram gradualmente a zero em três horas. A concentração de fosfato no plasma caiu 50% e os testes para as enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase indicaram que elas estavam elevadas após 90 minutos. A urina também foi positiva para frutose.

Comentário. Os resultados do teste de tolerância à frutose demonstraram um acúmulo de frutose e seus derivados no sangue e na urina. A elevação das enzimas do fígado, alanina e aspartato aminotransferase, bem como icterícia e outros sintomas, indicam lesão no fígado e sugerem que a Fru-1-P afeta o metabolismo de uma maneira similar à Gal-1-P na galactosemia.

OUTRAS VIAS DO METABOLISMO DE AÇÚCARES NUCLEOTÍDEOS

UDP-glicose

A UDP-Glc é precursora de uma série de outros açúcares, como o ácido glicurônico, xilose e galactose, os quais são necessários para a síntese de proteoglicanos e/ou glicoproteínas. As reações que levam à formação desses açúcares estão esboçadas nas Figuras 26.6 e 26.8. Uma oxidação em duas etapas pela enzima UDP-Glc desidrogenase leva à formação da forma ativada de ácido glicurônico (UDP-GlcUA). Este açúcar nucleotídeo é o doador de ácido glicurônico, tanto para a formação de proteoglicanos (Cap. 28) quanto para as reações de detoxificação e conjugação que ocorrem no fígado para remover bilirrubina, drogas e xenobióticos (Cap. 29). O UDP-GlcUA também é precursor de UDP-xilose, um açúcar nucleotídeo do tipo pentose. O UDP-GlcUA sofre uma reação de descarboxilação que remove o carbono-6 para formar UDP-xilose, a forma ativada da xilose. A xilose é o açúcar de ligação entre a proteína e o glicano nos proteoglicanos. A xilose também está presente em muitas glicoproteínas de plantas como parte de seus oligossacarídeos *N*-ligados, e é parcialmente responsável por reações alérgicas a proteínas do amendoim e de nozes.

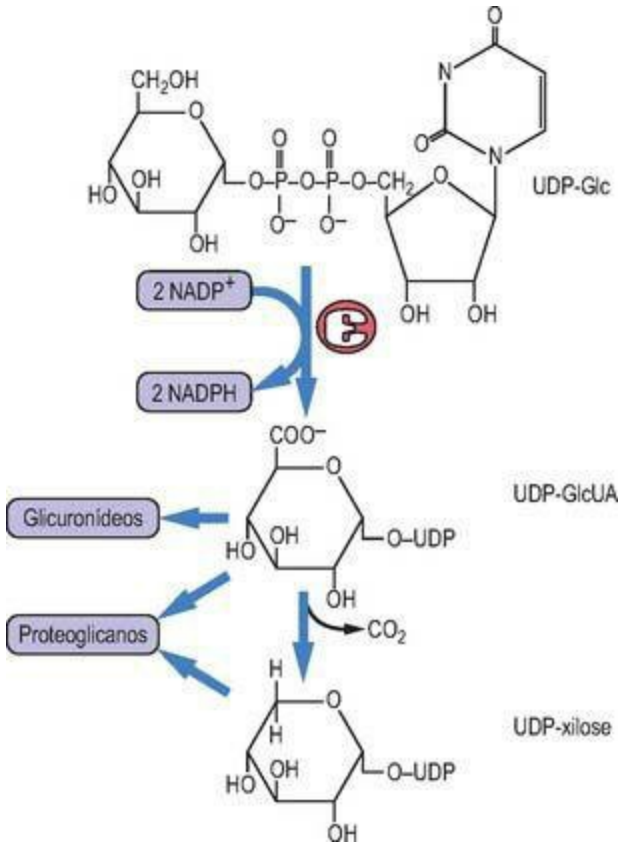


Fig. 26.8 Conversão de UDP-Glc em UDP-ácido glicurônico (UDP-GlcUA) e UDP-xilose. Note que a oxidação de UDP-Glc é uma reação em dois tempos, de álcool a aldeído, e então a um ácido. Ambas as reações são catalisadas pela UDP-Glc desidrogenase.

Guanosina difosfato-manose (GDP-Man)

A GDP-Man é o doador de manosil para os resíduos de manose nos oligossacarídeos *N*-ligados. Como mostrado na Figura 26.6, ela é produzida da Man-6-P e também é precursora de GDP-$_L$-fucose. A fucose é uma 6-desoxi-hexose que é um importante açúcar em muitas reações de reconhecimento, como a resposta inflamatória (Fig. 26.9). A conversão da GDP-Man em GDP-fucose envolve uma completa série de etapas oxidativas e redutoras, bem como epimerizações. Deficiências nas enzimas da via GDP-Man → GDP-fucose estão associadas a uma resposta inflamatória defeituosa e suscetibilidade aumentada à infecção. A síndrome de deficiência de leucócitos é causada por um defeito na síntese do sinal de reconhecimento do leucócito, a estrutura sialil Lewis-X (Fig. 26.9).

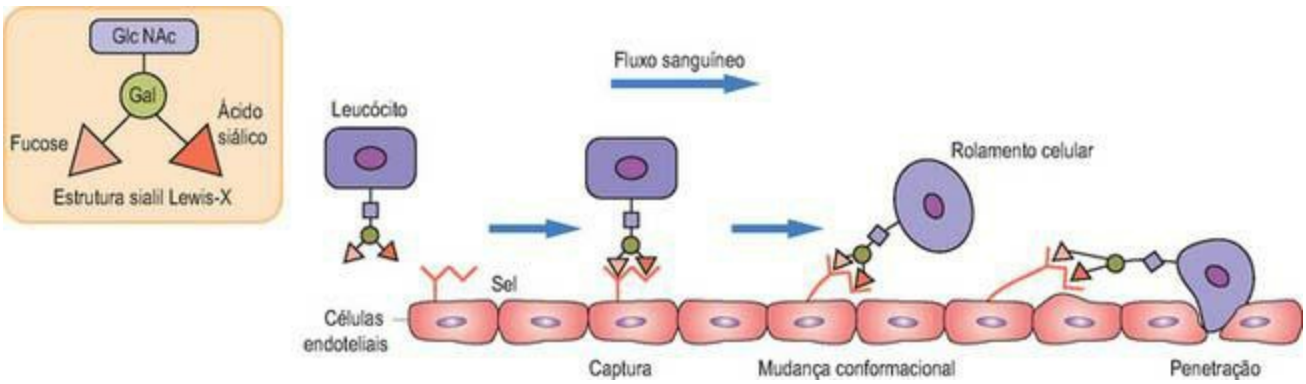


Fig. 26.9 Interações célula-célula dependentes de carboidrato na inflamação. Sialil Lewis-X, um antígeno tetrassacarídico que forma parte das estruturas de membrana dos leucócitos, é reconhecido por uma proteína ligante de carboidrato, a E-selectina (Sel), na superfície das células endoteliais. Os leucócitos são primeiro retardados, para então fazer o rolamento, e por fim penetrar na monocamada endotelial. Além disso, os leucócitos contêm L-selectinas, proteínas que reconhecem estruturas sacarídicas nas células endoteliais. Múltiplas cópias de carboidratos e receptores participam e fortalecem as interações célula-célula.

INTERAÇÕES CÉLULA-CÉLULA DEPENDENTES DE CARBOIDRATO

Um importante exemplo da interação célula-célula dependente de carboidrato ocorre durante a inflamação. Uma lesão ou infecção nas células endoteliais vasculares estimula uma resposta inflamatória que ocasiona a liberação de citocinas (proteínas estimulatórias que afetam a migração celular). Estas citocinas atraem os leucócitos para o sítio da lesão ou da infecção para remover o tecido danificado ou os organismos invasores. Os leucócitos devem ser capazes de parar ou sair do fluxo sanguíneo e se aderir ao tecido danificado. Eles são capazes de fazer isso porque têm carboidratos de reconhecimento de sinais em suas superfícies, que são reconhecidos por lecitinas (proteína de ligação a carboidrato) que se torna exposta na superfície das células endoteliais danificadas. O carboidrato sinal é um tetrassacarídeo chamado de antígeno sialil Lewis-X (Fig. 26-9), e este tetrassacarídeo é um componente de uma glicoproteína ou glicolipídico de superfície de leucócito. O antígeno sialil Lewis-X é reconhecido por uma lectina, a E-selectina, que é localizada na superfície da célula endotelial danificada. A interação entre esses dois capacita os leucócitos a se aderirem à parede vascular, mesmo sob a forte força da circulação. A Figura 26.9 apresenta um modelo demonstrando a química dessa interação. As selectinas medeiam a etapa inicial de adesão,

que é descrito como captura, seguida pelo rolamento dos leucócitos ao longo da superfície da célula endotelial. Na verdade, os leucócitos também contêm selectina, a L-selectina, que provavelmente interage com uma estrutura sacarídica similar à da superfície da célula endotelial. Estas interações de ligações do tipo fracas possibilitam os leucócitos a se aderirem, penetrarem na camada intersticial e limparem o local da lesão.

Enquanto a aderência dos leucócitos às células endoteliais é importante em combater a infecção, ela pode ser perigosa e uma ameaça à vida em outras circunstâncias. Assim, no infarto do miocárdio, os leucócitos podem causar o bloqueio das artérias, levando a uma isquemia. Devido à importância desta interação, muitas empresas de biotecnologia estão tentando desenvolver diferentes químicos, conhecidos como glicomiméticos, que imitam a estrutura do antígeno sialil Lewis-X. Espera-se que a administração de uma dessas drogas nos pacientes que tenham acabado de sofrer um ataque cardíaco bloqueie o sítio da selectina, prevenindo, portanto, a ligação dos leucócitos à parede vascular. Assim, este efeito poderia diminuir a probabilidade de futuras isquemias.

Comentário. Esse exemplo de interação carboidrato-proteína é apenas um de muitos que ocorrem *in vivo*. Cada um desses tipos de interações envolve uma lectina diferente, as quais possuem locais específicos de reconhecimento carboidrato. Uma vez que a estrutura do carboidrato é conhecida e o local de ligação à proteína tenha sido mapeado, pode ser possível para os químicos desenharem compostos que simulem a estrutura do carboidrato. Esses compostos sintéticos devem se ligar ao local da lectina de reconhecimento ao carboidrato e bloquear a interação natural. Uma das dificuldades desse modelo é que as interações de ligações individuais são fracas, e múltiplos contatos célula-célula são necessários; estes podem ser difíceis de ser bloqueados por drogas de moléculas pequenas. Um segundo problema é que a síntese de oligossacarídeos específicos é difícil e cara, e que grande quantidade precisa ser injetada no sangue para uma terapia efetiva.

Açúcares aminados

Fru-6-P é o precursor de açúcares aminados

A Figura 26.10 mostra a via de formação da GlcNAc, GalNAc e ácido siálico. A reação inicial envolve a transferência de um grupo amino do nitrogênio amida da glutamina para Fru-6-P para produzir glicosamina-6-P (GlcN-6-P). Um grupo acetil é então transferido da acetil-CoA para o grupo amino da GlcN-6-P para formar GlcNAc-6-P, que é convertida em UDP-GlcNAc, sua forma ativada, por reações sequenciais da mutase e da pirofosforilase. Além do seu papel como doador de GlcNAc, a UDP-GlcNAc também pode ser epimerizada em UDP-GalNAc. Com poucas exceções, todos os açúcares aminados nos glicoconjugados são acetilados; portanto, são neutros e não contribuem com qualquer carga iônica para os glicoconjugados.

Ácido siálico

A UDP-GlcNAc é o precursor do ácido *N*-acetil-neuramínico (NANA), também conhecido como ácido siálico. O ácido siálico, um ácido *N*-acetilamino-cetodeoxiglicônico de 9 carbonos, é produzido pela condensação de um açúcar aminado com o fosfoenolpiruvato (Fig. 26.10). O ácido neuramínico citidina monofosfato (ácido neuramínico-CMP) é a forma ativada do ácido siálico e o doador de ácido siálico nas reações biossintéticas. O ácido siálico-CMP é o único nucleosídeo monofosfato doador de açúcar no metabolismo de glicoconjugados.

BIOSSÍNTESE DE OLIGOSSACARÍDEOS

Oligossacarídeos *N*-ligados: a síntese inicia no retículo endoplasmático

A via de síntese dos oligossacarídeos *N*-ligados é iniciada com a transferência de dois resíduos de GlcNAc para um lipídeo ligado à membrana, chamado dolicol-fosfato. Os resíduos de manose e glicose são adicionados para construir um oligossacarídeo intermediário ligado ao lipídio, o qual é transferido para a proteína na luz do retículo endoplasmático (Fig. 26.11). Dolicóis são derivados poli-isoprenoides de cadeia longa, contendo geralmente cerca de 120 átomos de carbono (cerca de 22-26 unidades isopreno) com um grupo fosfato em um terminal. Eles são sintetizados em membranas usando a mesma maquinaria que é usada para fazer o esterol, mas em contraste com o esterol, os dolicóis permanecem como longas cadeias lineares. A linearidade da cadeia é requerida para que seja estendida sinuosamente através da bicamada fosfolipídica, proporcionando um forte gancho para a cadeia oligossacarídica em crescimento.

O primeiro açúcar a ser adicionado ao dolicol-P a partir da UDP-GlcNAc é a GlcNAc-1-P para produzir dolicol-P-P-GlcNAc. A segunda GlcNAc é ligada à primeira GlcNAc seguida de adição de quatro a cinco resíduos de manose a partir da GDP-Man. O dolicol-P-Man e o dolicol-P-Glc servem como doadores glicosídicos para as manoses e de três resíduos de glicose remanescentes, respectivamente. Cada um desses açúcares é transferido por uma glicosiltransferase específica localizada dentro ou na membrana do retículo endoplasmático. As glicoses não são encontradas em nenhum dos oligossacarídeos *N*-ligados nas glicoproteínas, mas são removidas pelas glicosidases no retículo endoplasmático. Por que elas são adicionadas em primeiro lugar? Elas exercem duas funções muito importantes. A primeira de todas, a presença de glicose nos oligossacarídeos associados a lipídio mostrou facilitar a transferência de oligossacarídeo do lipídio para a proteína – a enzima de transferência (oligossacarídeo transferase) tem preferência por oligossacarídeos que contêm três glicoses e transfere estes oligossacarídeos para a proteína muito mais rápido. Em segundo lugar, as glicoses são importantes para direcionar o enovelamento das proteínas no retículo endoplasmático (a seguir).

O processamento intermediário continua no retículo endoplasmático (RE) e no aparelho de Golgi

Em uma série de reações de adição e remoção (Fig. 26.12), todas as três glicoses são removidas no RE. O oligossacarídeo pode então permanecer como um oligossacarídeo rico em manose ou pode ser posteriormente processado em uma estrutura de oligossacarídeo complexa. Uma ou mais manoses podem ser removidas no RE, e a proteína enovelada é então translocada para o aparelho de Golgi, onde três ou quatro manoses adicionais podem ser removidas para deixar a estrutura central de três manoses e dois resíduos de GlcNAc. Esse oligossacarídeo central é então alongado no aparelho de Golgi.

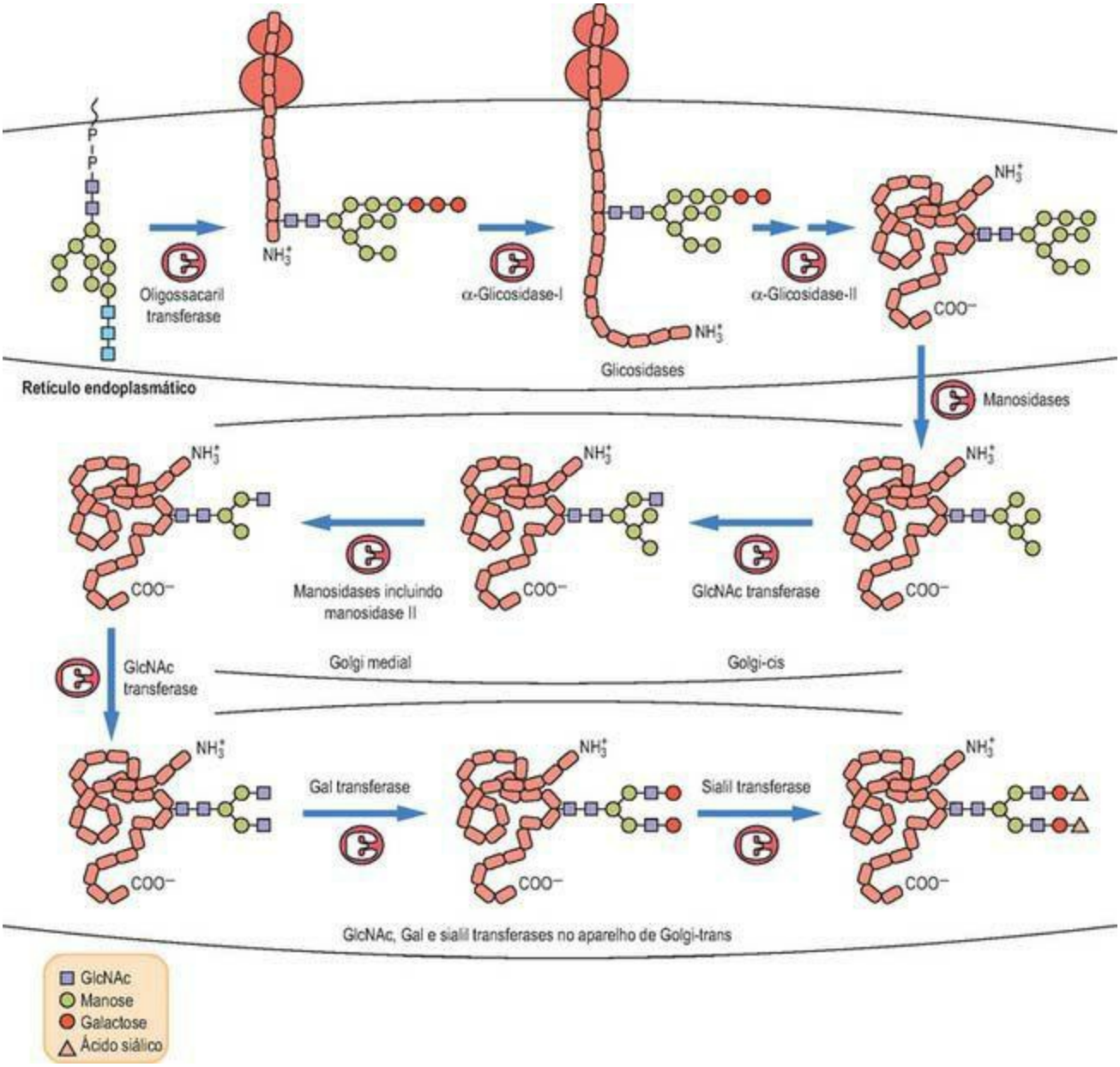


Fig. 26.12 Processamento de oligossacarídeos *N*-ligados da forma rica em manose à forma complexa. As glicoproteínas são transportadas entre o retículo endoplasmático e o compartimento de Golgi em vesículas. GlcNAc, *N*-acetilglicosamina.

As modificações finais dos oligossacarídeos N-ligados ocorrem no aparelho de Golgi

Após as reações de remoção no RE e enovelamento apropriado, a proteína com um ou mais oligossacarídeos $Man_{7\text{-}8}GlcNAc_2$ é transportada para o aparelho de Golgi, onde outras reações de modificação ocorrem (Fig. 26.12). Geralmente no Golgi-cis, várias outras manoses são removidas pelas α-manosidases para deixar somente a estrutura central. Também no Golgi-cis, resíduos de GlcNAc são adicionados a cada uma das manoses. Então, a proteína entra na fração Golgi-trans, onde os açúcares que restam das sequências trissacarídicas, isto é, galactose, ácido siálico e fucose, podem ser adicionados para fazer uma variedade de cadeias complexas diferentes. A estrutura final das cadeias de oligossacarídeos depende das glicosiltransferases existentes na célula.

Oligossacarídeos O-ligados

Em contrapartida com a biossíntese dos oligossacarídeos *N*-ligados, a síntese dos oligossacarídeos

O-ligados ocorre somente no aparelho de Golgi pela adição sequencial de açúcares, dos seus açúcares derivados de nucleotídeos, às proteínas. Nenhum intermediário lipídico está envolvido na formação de oligossacarídeos *O*-ligados. A Figura 26.13 resume a sequência de reações envolvidas na síntese de uma cadeia oligossacarídica na mucina salivar. Nessa sequência, a GalNAc é primeiro transferida da UDP-GalNAc para resíduos de serina ou treonina na proteína, por ação da GalNAc transferase no aparelho de Golgi. A proteína serina-GalNAc resultante serve como aceptor para galactose, e então o ácido siálico é transferido, de seus açúcares de nucleotídeos (UDP-Gal e ácido siálico-CMP) pelas enzimas galactosiltransferase e sialil transferase do Golgi. Outras glicosil transferases do Golgi estão envolvidas na biossíntese, passo a passo, de oligossacarídeos mais complexos da mucina e na síntese de oligossacarídeos *O*-ligados nos proteoglicanos e colágenos (Cap. 28). Existem mais de 100 glicosil transferases envolvidas na síntese de glicoconjugados numa célula típica.

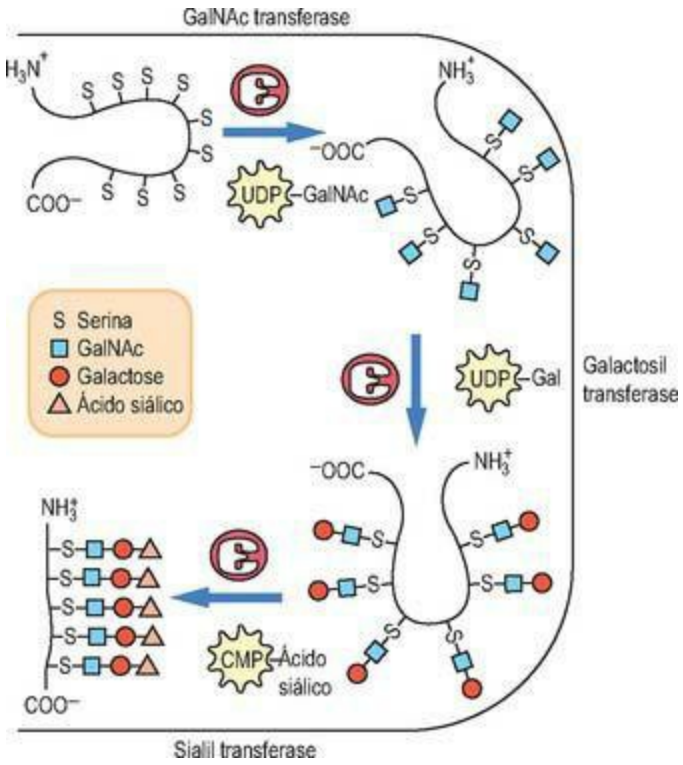


Fig. 26.13 Biossíntese de oligossacarídeos *O*-ligados de mucinas no aparelho de Golgi. GalNAc, *N*-acetilgalactosamina.

INIBIDORES DA BIOSSÍNTESE DE GLICOPROTEÍNAS

Diversos inibidores da síntese de oligossacarídeos *N*-ligados têm sido identificados e esses compostos têm provado ser valiosos reagentes para estudos sobre o papel de estruturas de carboidratos específicas na função das glicoproteínas. Tunicamicina é um antibiótico glicosídico que inibe o primeiro passo na síntese de oligossacarídeos *N*-ligados, isto é, a formação de dolicol-PP-GlcNAc (Fig. 26.11). A tunicamicina tem vários efeitos sobre a síntese de glicoproteínas e sobre as células, de benignos a profundos. Em alguns casos, a porção proteica da glicoproteína é sintetizada, mas sem seu carboidrato fica insolúvel, agrega e é degradada na célula. Algumas células não crescem na presença dessa droga, mas outras não são afetadas. Uma série de outros inibidores tem

sido identificada que inibem passos específicos na via de processamento. Muitos são alcaloides de plantas que estruturalmente se parecem com os açúcares glicose e manose, e inibem as glicosidases removedoras (Fig. 26.12). A castanoespermina inibe as glicosidases do RE, enquanto a swainsonina e a kifunensina inibem, cada uma, uma manosidase de processamento diferente. Essas drogas evitam a formação de cadeias complexas, portanto são úteis para avaliar as relações estrutura-função. Alguns compostos foram testados contra o HIV e contra alguns cânceres, e têm mostrado efeitos inibitórios positivos. Entretanto, eles também têm efeitos adversos sobre outras enzimas em células normais e não são, portanto, usados como drogas viáveis. Com compostos mais específicos, pode ser possível manipular as estruturas dos glicanos para propósitos terapêuticos.

FUNÇÕES DAS CADEIAS DE OLIGOSSACARÍDEOS DAS GLICOPROTEÍNAS

Oligossacarídeos N-ligados têm importante papel no enovelamento de proteínas

Proteínas residentes no retículo endoplasmático, conhecidas como chaperonas, auxiliam as proteínas de membrana recém-sintetizadas a se enovelarem em suas conformações apropriadas. Duas dessas chaperonas, a calnexina e a calreticulina, ligam-se a glicoproteínas não enoveladas com o reconhecimento dos oligossacarídeos ricos em manose que ainda contêm uma única glicose remanescente em sua estrutura, após as glicosidases terem removido duas das três glicoses. Nem todas as glicoproteínas sintetizadas na célula requerem auxílio no enovelamento, mas para aquelas que precisam, a taxa de enovelamento é altamente acelerada pelas chaperonas. Proteínas enoveladas incorretamente ou não enoveladas não são transportadas normalmente para o aparelho de Golgi e, se não forem corretamente enoveladas, são com frequência degradadas no retículo endoplasmático ou no citoplasma.

Oligossacarídeos ricos em manose direcionam algumas proteínas para locais específicos na célula

Os lisossomos são organelas subcelulares envolvidas na hidrólise e renovação de muitas organelas e proteínas celulares. Eles contêm várias enzimas com pH ótimo ácido. A maioria, se não todas, das enzimas lisossomais são glicoproteínas *N*-ligadas, que são sintetizadas e glicosiladas no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi. O direcionamento das enzimas lisossomais ocorre no Golgi-cis. As proteínas destinadas aos lisossomos contêm um conjunto de resíduos de lisina que ficam reunidos como resultado do enovelamento da proteína em sua conformação apropriada. Como mostrado na Figura 26.14, esse *cluster* de resíduos de lisina serve como um sítio de ancoramento para uma enzima, a GlcNAc-1-P transferase, que transfere uma GlcNAc-1-P da UDP-GlcNAc para o resíduo de manose terminal, nas cadeias ricas em manose das enzimas lisossomais. Uma segunda enzima, chamada hexosaminidase, remove a GlcNAc, deixando os resíduos de fosfato ainda ligados às manoses nas cadeias ricas em manose. Os resíduos de Man-6-P resultantes na estrutura rica em manose são reconhecidos por uma proteína do Golgi chamada de receptor de Man-6-P que de alguma forma empurra ou direciona a enzima para os lisossomos. Assim, os resíduos de Man-6-P são um sinal-alvo usado pela célula para classificar aquelas proteínas que são destinadas a irem para o lisossomo, e separá-las de todas as outras proteínas que estão sendo sintetizadas no aparelho de Golgi. O receptor de Man-6-P também está presente na superfície das células, de modo que mesmo as enzimas extracelulares que tenham este sinal são endocitadas e transportadas para os lisossomos.

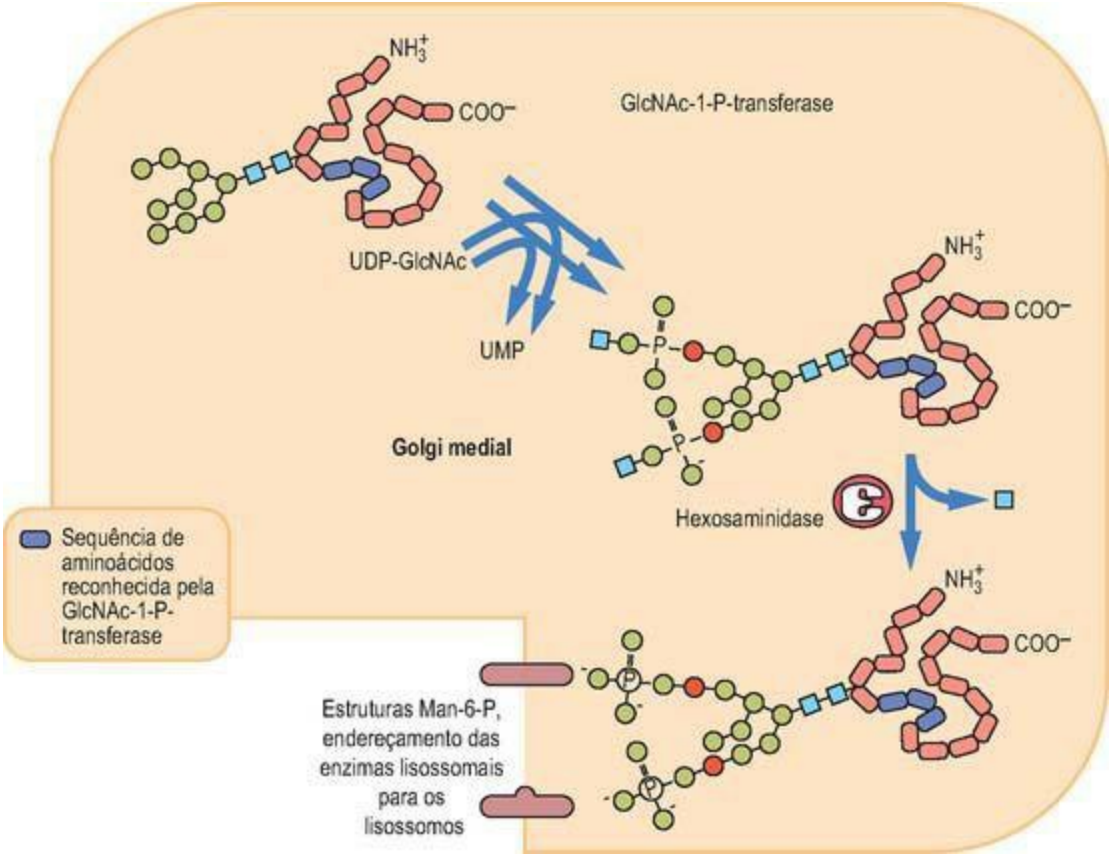


Fig. 26.14 Endereçamento de enzimas lisossomais para os lisossomos. GlcNAc, *N*-acetilglicosamina; Man, manose.

As cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas frequentemente aumentam a solubilidade e estabilidade das proteínas

DEFICIÊNCIA NA SÍNTESE DE GLICOPROTEÍNAS

As síndromes da glicoproteína deficiente em carboidratos (CDGS) consistem num grupo de doenças genéticas raras descrito recentemente que afeta a biossíntese das glicoproteínas. Todos os pacientes mostram patologia multissistêmica, com grave envolvimento do sistema nervoso. Três classes distintas foram identificadas até o momento e são caracterizadas por uma deficiência na estrutura do carboidrato ligado às glicoproteínas do soro, enzimas lisossomais ou glicoproteínas de membrana. O diagnóstico dessa doença é rotineiramente feito por eletroforese da transferrina do soro. Nas CDGS, a transferrina contém menos ácido siálico e, portanto, a proteína migra mais lentamente. A diminuição do ácido siálico resulta de um defeito na biossíntese da estrutura oligossacarídica principal. Enquanto a mudança na migração da transferrina do soro indica que o paciente está sofrendo de uma das CDGS, isso não identifica a lesão específica. Isso pode ser feito somente ou caracterizando a estrutura da(s) cadeia(s) de oligossacarídeo alteradas para determinar quais açúcares ou estruturas estão faltando, ou fazendo o perfil das enzimas-chave da via de biossíntese, desde que a ausência de qualquer uma dessas enzimas afete a estrutura final do oligossacarídeo.

Comentário. Os defeitos básicos nesse grupo de doença parecem estar na síntese ou processamento dos oligossacarídeos *N*-ligados. Entretanto, defeitos na fosfomanose isomerase e fosfomanose mutase também têm sido identificados como causa da CDGS.

Em razão de os oligossacarídeos serem hidrofílicos, eles aumentam a solubilidade de proteínas no meio aquoso. Assim, a maioria das proteínas que são secretadas pelas células são glicoproteínas, incluindo as proteínas do plasma. Essas glicoproteínas e enzimas geralmente também têm alta estabilidade ao calor, desnaturantes químicos, detergentes, ácidos e bases. A remoção enzimática dos carboidratos de muitas dessas proteínas reduz muito sua estabilidade ao estresse. Na verdade, quando as glicoproteínas são sintetizadas nas células em presença de inibidores de glicosilação, como a tunimicina, que impede a produção e portanto a ligação da cadeia de oligossacarídeos *N*-ligados, muitas dessas proteínas tornam-se insolúveis e formam inclusões nas células como resultado de um enovelamento incorreto e/ou diminuição da hidrofilicidade.

Os açúcares estão envolvidos nas interações de reconhecimento químico com as lectinas

As glicoproteínas *N*-ligadas de superfície das células de mamíferos têm papel fundamental nas interações célula-célula e outros processos de reconhecimento. Uma célula pode conter em sua superfície uma proteína reconhecedora de carboidrato, conhecida como lectina, que se liga a estruturas oligossacarídicas específicas na superfície da célula complementar. A interação entre essas duas interfaces químicas medeia um reconhecimento químico específico entre as células, e tal processo é um fator-chave na fertilização, inflamação, infecção, desenvolvimento e diferenciação.

DOENÇA DE CÉLULA-I

A doença de célula-I (mucolipidose II) e a polidistrofia pseudo-Hurler (mucolipidose III) são doenças inatas raras causadas por deficiências na maquinaria que direciona as enzimas lisossomais para os lisossomos. A apresentação clínica inclui grave retardo psicomotor, traços faciais grosseiros e anormalidades esqueléticas; a morte geralmente ocorre na primeira década de vida. Em culturas de fibroblastos extraídos de pacientes com mucolipidose II, enzimas lisossomais recém-sintetizadas são secretadas no meio extracelular em vez de serem endereçadas corretamente para os lisossomos. Células mesenquimais, especialmente fibroblastos, contêm numerosos vacúolos ligados à membrana no citoplasma, contendo material fibrilogranular. Esses depósitos são chamados de corpos de inclusão e essa é a origem do nome doença de célula-I.

Comentário. A doença de célula-I resulta de uma deficiência na síntese do sinal de endereçamento, resíduos de Man-6-P nos oligossacarídeos ricos em manose. A mutação mais comum é a ausência da GlcNAc-1-P fosfotransferase, mas defeitos na hexosaminidase também ocorrem. É provável que a ausência da proteína receptora de Man-6-P poderia gerar o mesmo fenótipo. Na doença de célula-I os lisossomos, deficientes em todo o espectro de enzimas hidrolases, tornam-se repletos de substâncias não digeríveis.

As interações proteína-carboidrato também são importantes nas interações com estruturas não próprias. Muitos patógenos usam esse mecanismo para reconhecer suas células-alvo. A *E. coli*, por exemplo, e algumas outras bactérias entéricas gram-negativas têm curtas projeções semelhantes a pelo em suas superfícies chamadas pili. Esses pili têm lectinas ligantes de manose em sua extremidade, que podem reconhecer e se ligar a oligossacarídeos ricos em manose na membrana em borda escova das células epiteliais intestinais. Essa interação permite a bactéria ser retida no intestino. Um mecanismo similar é usado por algumas bactérias simbiônticas no trato intestinal. O vírus influenza usa a proteína hemaglutinina na sua superfície para se ligar aos resíduos de ácido

siálico nas glicoproteínas e glicolipídios da superfície de células-alvo.

Variações na estrutura da mucina parecem ter função específica na fertilização, diferenciação celular, desenvolvimento de resposta imune e infectividade do vírus. A glicoproteína ZP3, que está presente na zona pelúcida do óvulo de camundongos, funciona como um receptor para o espermatozoide durante a fertilização. A remoção enzimática de oligossacarídeos *O*-ligados da ZP3 resulta na perda da atividade de receptor para o espermatozoide, enquanto a remoção de oligossacarídeos *N*-ligados não tem qualquer efeito sobre a ligação do espermatozoide. Os oligossacarídeos *O*-ligados isolados da ZP3 também possuem atividade de ligação ao espermatozoide e inibem a interação óvulo-espermatozoide e a fertilização *in vitro*. Diferenças entre as estruturas *O*-glicano de linfócitos citotóxicos e células auxiliares envolvidas na resposta imune também são consideradas importantes em mediar interações celulares durante a resposta imune.

TOXICIDADE DA RICINA E OUTRAS LECTINAS

As lectinas são encontradas em uma variedade de alimentos, incluindo feijões, amendoim e cereais secos. Muitas lectinas de plantas são tóxicas para as células animais. Nas plantas comestíveis podem não representar um problema desde que o alimento seja cozido, e as lectinas sejam desnaturadas, ficando portanto suscetíveis às proteases intestinais. Por sua vez, as lectinas em plantas não cozidas são bastante resistentes às proteases e podem, portanto, causar sérios problemas. Elas se ligam às células no trato gastrointestinal, inibindo atividades enzimáticas, a digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes, causando desconforto gastrointestinal e reações alérgicas.

A ricina, produzida pela planta mamona, está entre as proteínas mais tóxicas já conhecidas pelo homem. Esses tipos de lectinas tóxicas são geralmente compostos de várias subunidades, uma das quais é o sito ligante ou de reconhecimento de carboidrato, enquanto a outra subunidade é uma enzima que pode cataliticamente inativar os ribossomos. Assim, a entrada de uma única molécula dessa subunidade catalítica na célula pode bloquear completamente a síntese proteica naquela célula. Outras lectinas tóxicas incluem a modecina, abrina e lectina I do visco.

MUDANÇAS NA COMPOSIÇÃO E/OU ESTRUTURA DO AÇÚCAR PODEM SER MARCADORES DIAGNÓSTICOS DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER

Mudanças na glicosilação de proteínas e lipídios têm sido relatadas nos carboidratos de superfície celular de vários tipos de células cancerosas, incluindo melanomas, câncer de ovário e carcinoma hepatocelular. Enquanto essas alterações não são consideradas causas da doença, elas têm sido avaliadas como ferramentas diagnósticas para detecção precoce da doença. Níveis aumentados da enzima GlcNAc transferase V (a transferase envolvida na adição de um segundo [ramificador] resíduo de GlcNAc ao resíduo de manose para fazer uma cadeia complexa triantenária) são altamente expressos em algumas células transformadas, resultando em aumento das ramificações e produção de oligossacarídeos *N*-ligados maiores. Alterações nos oligossacarídeos *O*-ligados também têm sido descritas, por exemplo, níveis aumentados do antígeno sialil Lewis-X, o qual se acredita contribuir para a metástase. Mudanças na quantidade e sialização de mucinas também estão associadas a metástases de pulmão e células de carcinoma de colo e estão sendo estudadas para sua

aplicabilidade como biomarcadores de diagnóstico ou prognóstico.

Também existe evidência que alterações no nível de fucose em algumas glicoproteínas regulam o fenótipo biológico das células cancerosas, e de fato a fucosilação da proteína α-fetoproteína (AFP-L3) tem sido usada clinicamente como um marcador para carcinoma hepatocelular.

Comentário. Há uma considerável evidência para indicar que a estrutura e a composição de glicoproteínas e glicolipídios estão alteradas em células tumorais, comparadas às células normais. Enquanto essas mudanças podem não provocar o câncer, elas podem ter um efeito significante na clínica, por exemplo, se elas limitam o infiltrado leucocitário, ajudam no escape à vigilância imune ou facilitam a metástase. A análise das estruturas oligossacarídicas pode ser útil para detecção precoce e propósitos diagnósticos, e a manipulação de estruturas oligossacarídicas pode ser útil no tratamento de alguns cânceres.

Resumo

A glicosilação é a maior modificação pós-traducional das proteínas teciduais. A glicosilação é uma atividade multicomportamental, envolvendo a interconversão de açúcares e ativação de compartimentos citosólicos, formando estruturas complexas nos intermediários lipídicos no RE, e glicosilação e reações de clivagem no RE e no aparelho de Golgi. O resultado é uma espantosa variedade de estruturas oligossacarídicas nas proteínas. Esses açúcares podem ter diversas funções diferentes, incluindo:

- Modificação das propriedades físicas das proteínas (solubilidade, estabilidade e/ou viscosidade).
- Auxílio no enovelamento de proteínas.
- Participação no endereçamento de proteínas para sua localização apropriada na célula.
- Medeia os reconhecimentos célula-proteína e célula-célula durante a fertilização, desenvolvimento, inflamação e outros processos.

Uma série de doenças humanas envolve defeitos no metabolismo de açúcar, incluindo galactosemia e intolerância hereditária à frutose, doença de deficiência leucocitária, síndromes da glicoproteína deficiente em carboidrato (CDGS) e doenças de armazenamento lisossomal. É importante determinar como os açúcares podem interagir em várias reações de reconhecimento e como eles podem promover estabilidade e afetar as propriedades físicas de proteínas e lipídeos, desde que esta informação possa fornecer mecanismos para prevenir ou interceder em várias doenças.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Por que as células eucarióticas usam oligossacarídeos ligados à lipídios como intermediários na síntese de oligossacarídeos *N*-ligados, mas não de oligossacarídeos *O*-ligados?

2. As células animais precisam de açúcares aminados na dieta para sintetizarem carboidratos complexos? Se não, por quê? Reveja o uso de suplementos de condroitin-glicosamina para o tratamento de artrite.

3. Descreva o papel das interações célula-célula dependentes de carboidrato durante o desenvolvimento do sistema nervoso ou imune.

Sites

Síndrome da glicoproteína deficiente em carboidrato: www.familyvillage.wisc.edu/lib_cdgs.htm
Galactosemia: www.galactosemia.org/
Biossíntese de glicoproteínas: http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/cho/glycoproteinshtm.htm
Intolerância hereditária à frutose: www.bu.edu/aldolase/HFI/
Doença de célula-I: www.emedicine.com/ped/topic1150.htm
Lectinas: www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/lectins/lectins.html
Mucopolissacaridoses: www.mpssociety.org/

Leituras sugeridas

Asano N. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology*. 2003;13:93R-r104R.

Boehncke WH, Schon MP. Interfering with leukocyte rolling – a promising therapeutic approach in inflammatory skin disorders? *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:49-52.

Gerber-Lemaire S, Juillerat-Jeanneret L. Glycosylation pathways as drug targets for cancer: glycosidase inhibitors. *Mini Rev Med Chem*. 2006;6:1043-1052.

Gorelik E, Galili U, Raz A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2001;20:245-277.

Kato K, Kamiya Y. Structural views of glycoprotein-fate determination in cells. *Glycobiology*. 2007;17:1031-1044.

Marquardt T, Denecke J. Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. *Eur J Pediatr*. 2003;162:359-379.

Mouricout M. Interactions between the enteric pathogens and the host. An assortment of bacterial lectins and a set of glycoconjugate receptors. *Adv Exp Med Biol*. 1997;412:109-123.

Novelli G, Reichardt JK. Molecular basis of disorders of human galactose metabolism: past, present, and future. *Mol Genet Metab*. 2000;71:62-65.

WA PetriJr, R. Haque, BJ Mann. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite Entamoeba histolytica. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:39-64.

Rubin BK. Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care*. 2002;47:761-768.

Sites

Síndrome da glicoproteína deficiente em carboidrato Síndrome da glicoproteína deficiente em carboidrato. www.familyvillage.wisc.edu/lib_cdgs.htm.

Galactosemia Galactosemia. www.galactosemia.org/.

Biossíntese de glicoproteínas Biossíntese de glicoproteínas. http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/cho/glycoproteinshtm.htm.

Intolerância hereditária à frutose Intolerância hereditária à frutose. www.bu.edu/aldolase/HFI/.

Doença de célula-I Doença de célula-I. www.emedicine.com/ped/topic1150.htm.

Lectinas Lectinas. www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/lectins/lectins.html.

Mucopolissacaridoses Mucopolissacaridoses. www.mpssociety.org/.

Lipídios Complexos

A.D. Elbein

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever como os vários fosfolipídios baseados em glicerol são sintetizados e como eles são interconvertidos.

- Descrever os múltiplos papéis dos nucleotídeos citidina na ativação de intermediários na síntese dos fosfolipídios.

- Descrever os vários tipos de esfingolipídios e glicolipídios que ocorrem em células de mamíferos e suas funções.

- Explicar a etiologia das doenças de armazenamento lisossomal, sua patologia, e o racional da terapia de reposição de enzimas para o tratamento dessas doenças.

INTRODUÇÃO

Os Lipídios complexos abrangem os glicerofosfolipídios, introduzidos no capítulo 3, e os esfingolipídios. Essas moléculas são encontradas em sua maioria em duas localizações: embebidas em membranas biológicas ou nas lipoproteínas circulantes. Os esfingolipídios são quase exclusivamente encontrados nas membranas celulares, e sobretudo na membrana plasmática. Eles carreiam muitos carboidratos na face que está em contato com o ambiente exterior, como as glicoproteínas, que têm amplas funções de reconhecimento. A maior diferença entre essas duas classes de lipídios é que os glicerofosfolipídios são saponificáveis (exceto os plasmalogênios), enquanto os esfingolipídios não contêm ligações ésteres alcalilábeis. Assim, foi conveniente isolar os esfingolipídios dos tecidos por saponificação, fazendo então a extração dos lipídios remanescentes em solventes orgânicos. Uma vez isolado, a caracterização da estrutura glicana dos esfingolipídios foi tecnicamente desafiadora. Por isso, as estruturas foram, por um longo tempo, desconhecidas e misteriosas, levando ao seu nome: semelhantes à esfinge ou esfingolipídios.

Este capítulo discute a estrutura, biossíntese e função das duas maiores classes de lipídios polares: os glicerofosfolipídios e os esfingolipídios. Em uma preparação para este capítulo, a revisão das estruturas dos fosfolipídios no capítulo 3 deve ajudar.

SÍNTESE E *TURNOVER* DE GLICEROFOSFOLipídios

Precursores: ácido fosfatídico e diacilglicerol (DAG)

Todas as células animais, exceto os eritrócitos, são capazes de sintetizar fosfolipídios de novo, enquanto a síntese de triglicerídeo ocorre principalmente no fígado, tecido adiposo e células intestinais. Como na Figura 27.1, ácido fosfatídico e 1-2-diacilglicerol (DAG) são intermediários comuns na síntese de triglicerídeos (triacilgliceróis) e fosfolipídios. O glicerol-3-fosfato é o principal material usado na síntese de ácido fosfatídico; ele é formado na maioria dos tecidos pela redução do intermediário glicolítico, di-hidroacetona fosfato (DHAP). No fígado, rim e intestino, o glicerol-3-P também pode ser formado diretamente via fosforilação de glicerol por uma quinase específica.

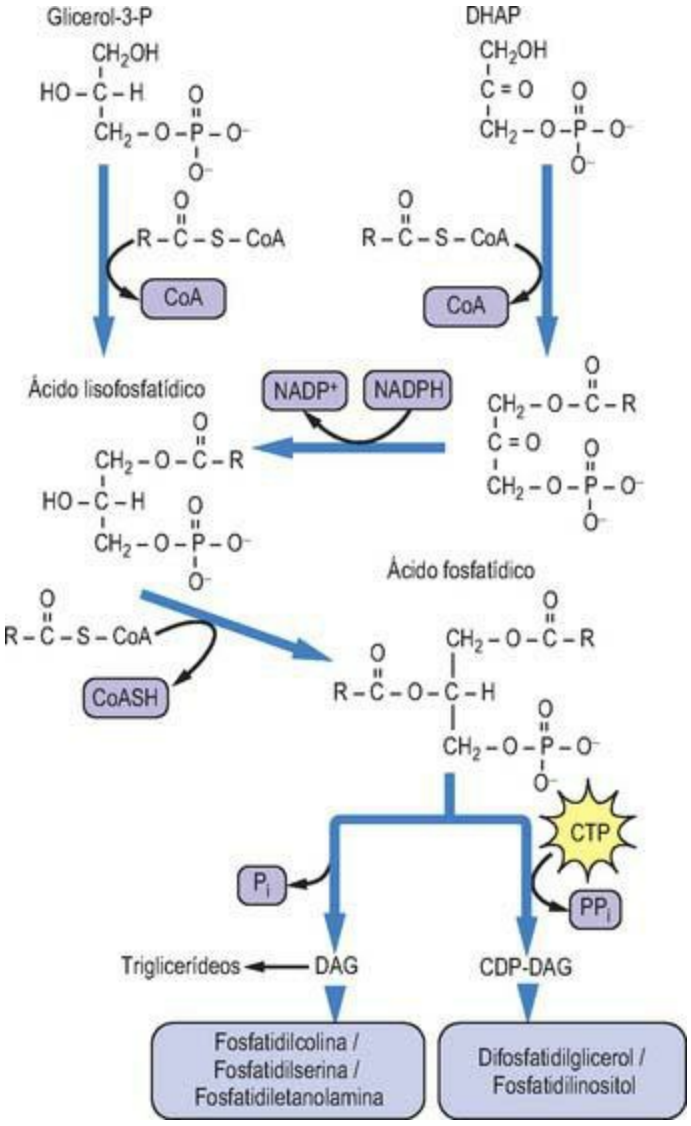


Fig. 27.1 Via de formação do ácido fosfatídico e sua conversão em diacilglicerol (DAG) e principais fosfolipídios. CDP, difosfato de citidina; CTP, trifosfato de citidina; CoASH, coenzima A; DHAP, fosfato de di-hidroacetona; Pi, fosfato inorgânico; PPi, pirofosfato inorgânico.

O glicerol-3-P é acetilado por transferência de dois ácidos graxos de cadeia longa da acetil-CoA aos grupamentos hidroxil nos carbonos 1 e 2, produzindo ácido fosfatídico. O primeiro ácido graxo, geralmente um ácido graxo saturado, é adicionado ao carbono-1, formando ácido

lisofosfatídico; o prefixo “liso” indica que um dos grupamentos hidroxila foi lisado, isto é, não acetilado. Então, um segundo ácido graxo, geralmente um ácido graxo insaturado, é adicionado ao carbono-2 para formar o ácido fosfatídico. A DHAP pode também ser acetilada pela adição de um ácido graxo ao grupamento hidroxil-1, e este intermediário é então reduzido e acetilado a ácido fosfatídico. O ácido fosfatídico é convertido em DAG por uma fosfatase citosólica específica.

Biossíntese de fosfolipídios

A biossíntese da lecitina (fosfatidilcolina) do DAG requer ativação da colina a um derivado de nucleotídeo difosfato de citidina (CDP). Nessa série de reações, mostrada na Figura 27.2, o "grupamento cabeça" colina é convertido em fosfocolina e então ativado à CDP-colina por uma reação pirofosforilase. A ligação pirofosfato é clivada a fosfocolina (fosfato de colina) e transferida para o DAG para formar a lecitina. Essa reação é análoga à transferência da GlcNAc-6-P ao dolicol ou ao centro rico em manose das enzimas lisossomais – ambos, açúcar e um fosfato, são transferidos do derivado nucleotídeo. A fosfatidiletanolamina é formada por uma via similar usando trifosfato de citidina (CTP) e fosfoetanolamina, para formar CDP-etanolamina.

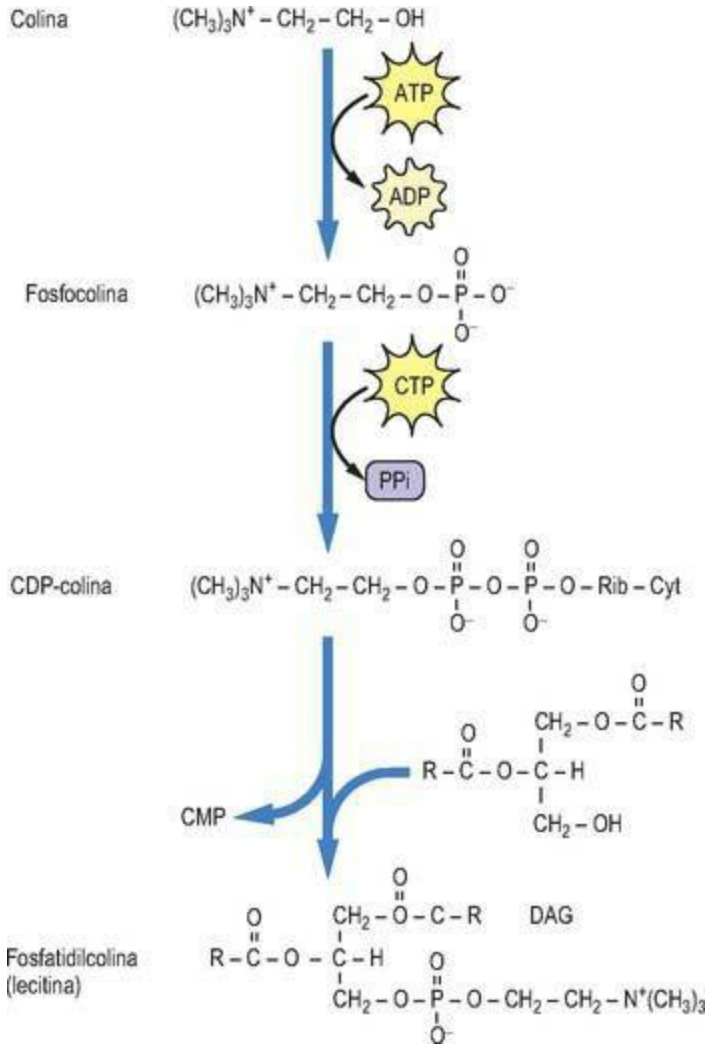


Fig. 27.2 Formação da fosfatidilcolina pela via CDP-colina. Cyt, citosina; CDP, difosfato de citosina; CMP, monofosfato de citidina; DAG, diacilglicerol; Rib, ribose; CTP, trifosfato de citidina.

Ambos, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, podem reagir com a serina livre por uma reação de troca para formar fosfatidilserina e uma base livre, colina ou etanolamina (Fig. 27.3). Em uma via secundária, a fosfatidilcolina também pode ser formada pela metilação da fosfatidiletanolamina com um doador metil, S-adenosilmetionina (SAM) (Fig. 27.4). A via de metilação envolve a transferência sequencial de três grupamentos metil ativados de três diferentes moléculas de SAM. O fígado tem também outra rota para a fosfatidiletanolamina, envolvendo a descarboxilação da fosfatidilserina por

uma descarboxilase mitocondrial específica.

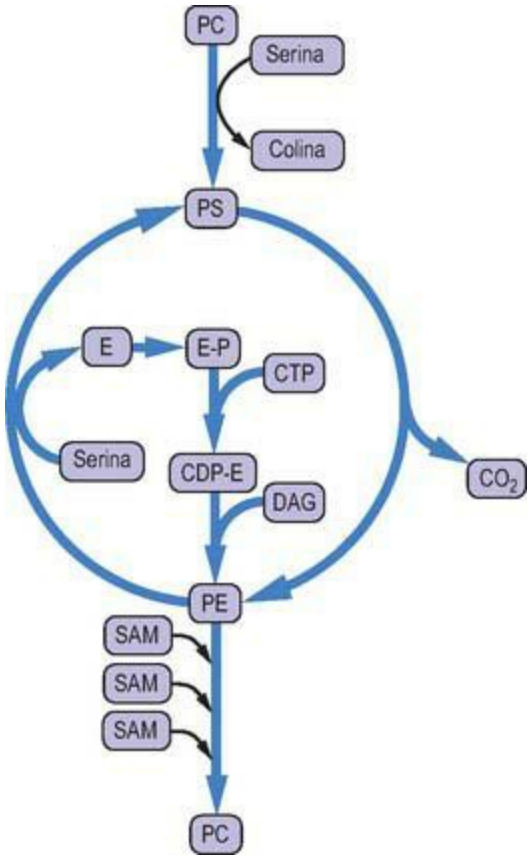


Fig. 27.3 Vias de interconversão de fosfolipídios pela troca de grupamentos cabeça, por metilação ou por descarboxilação. E, etanolamina; DAG, diacilglicerol; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; SAM, *S*-adenosilmetionina.

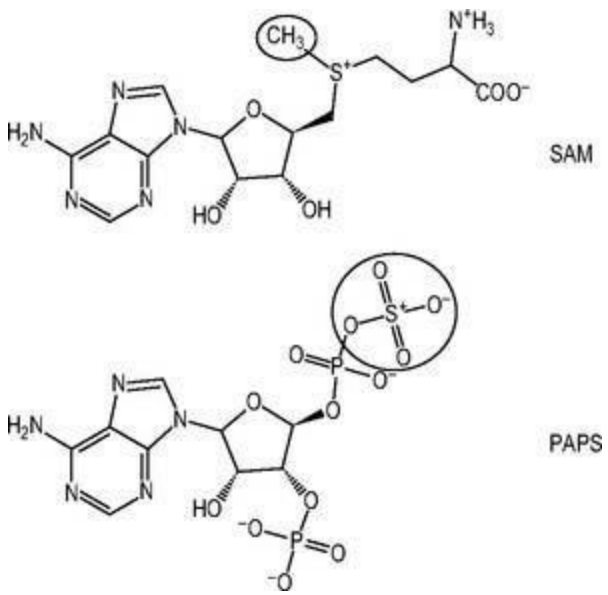


Fig. 27.4 Estruturas de doadores de metil e sulfato envolvidos na síntese de lipídios de membrana. SAM, *S*-adenosilmetionina; PAPS, 3′-fosfoadenosina-5′-fosfossulfato (sulfato ativo).

Os fosfolipídios que têm um álcool como grupamento cabeça, por exemplo, fosfatidilglicerol e fosfatidilinositol, são sintetizados por uma via alternativa, que também envolve ativação de

nucleotídeos citidina. Nesse caso, o ácido fosfatídico é ativado, em vez do grupamento cabeça, produzindo CDP-DAG (Fig. 27.5). O grupamento ácido fosfatídico é então transferido para o glicerol livre ou o inositol, para formar fosfatidilglicerol ou fosfatidilinositol, respectivamente. Um segundo ácido fosfatídico também pode ser adicionado ao fosfatidilglicerol para formar o 1,3-difosfatidilglicerol (DPG). Este lipídio, conhecido como cardiolipina, é encontrado quase exclusivamente no interior da membrana mitocondrial; ele representa cerca de 20% dos fosfolipídios nas mitocôndrias cardíacas e é requerido para a atividade eficaz dos complexos III e IV, transportadores de elétrons, e a ATP:ADP translocase.

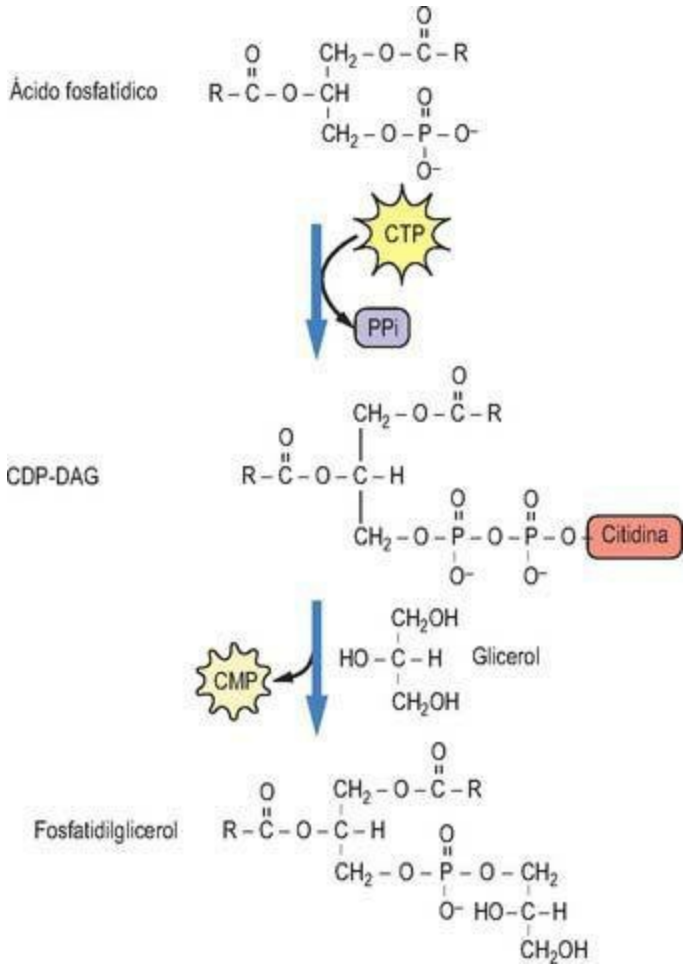


Fig. 27.5 Formação de fosfatidilglicerol pela ativação de ácido fosfatídico para formar CDP-DAG, e tranferência do DAG ao glicerol. CMP, monofosfato de citidina; CTP, trifosfato de citidina.

Os plasmalogênios são a segunda maior classe de lipídios mitocondriais, e estão em grandes quantidades em nervos e tecido muscular; no coração, podem somar cerca de 50% do total de fosfolipídios. A biossíntese de plasmalogênios procede do DHAP: ele é primeiro acetilado no C-1, o grupamento acil permuta com um álcool de lipídio para formar um lipídio tipo éter, então o lipídio tipo éter é dessaturado, levando por fim ao alquil éterfosfolipídio. A função dos plasmalogênios *versus* os diacilfosfolipídios ainda não está clara, mas existem algumas evidências que eles são mais resistentes ao dano oxidativo, podendo promover proteção contra o estresse oxidativo nos tecidos com metabolismo aeróbico ativo (Cap. 37).

Turnover de fosfolipídios

Os fosfolipídios estão em um estado contínuo de *turnover* na maioria das membranas. Isso ocorre como resultado do dano oxidativo, durante a inflamação, e com a ativação de lipases, particularmente em resposta ao estímulo hormonal. Como mostrado na Figura 27.6, existem várias fosfolipases que atuam em ligações específicas nas estruturas fosfolipídicas. As fosfolipases A_2 (PLA_2) e C (PLC) são particularmente ativas durante a resposta inflamatória e nas transduções de sinais. A fosfolipase B (não mostrada) é uma lisofosfolipase que remove o segundo grupamento acil após ação da PLA_1 ou PLA_2. Os lisofosfolipídios podem ser degradados ao ácido fosfatídico ou reciclados (reacilado) por vias *scavenger*.

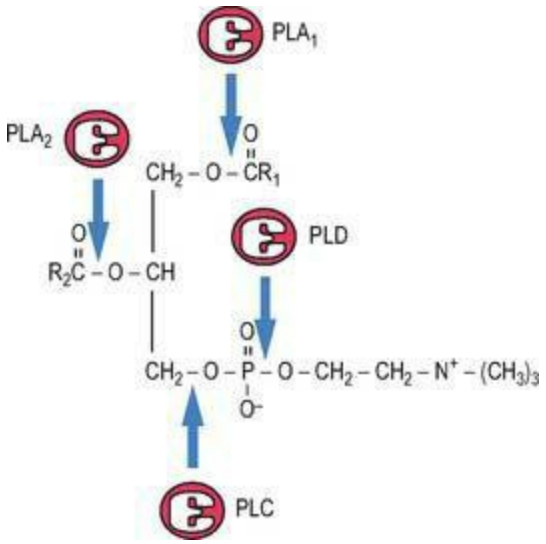


Fig. 27.6 Locais de ação de fosfolipases na fosfatidilcolina. PLA_1, PLA_2, PLC, PLD são fosfolipases A_1, A_2, C e D, respectivamente.

FUNÇÃO DO SURFACTANTE DE FOSFOLIPÍDIOS: A SÍNDROME DA INSUFICIÊNCIA RESPIRATÓRIA AGUDA (SARA)

A síndrome da insuficiência respiratória aguda (SARA) é responsável por cerca de 15%-20% da mortalidade neonatal em países do Ocidente. Essa doença afeta somente crianças prematuras e sua incidência é diretamente relacionada ao grau de prematuridade.

Comentário. Os pulmões imaturos não têm células epiteliais tipo II suficientes para sintetizar o conteúdo de fosfolipídios, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Esses fosfolipídios constituem mais de 80% dos fosfolipídios totais da camada de lipídio extracelular que recobre os alvéolos de pulmões normais. A DPPC diminui a tensão de superfície da camada superficial aquosa dos pulmões, facilitando a abertura dos alvéolos durante a inspiração. A deficiência de surfactante causa o colapso dos pulmões durante a fase de expiração da respiração, levando à SARA. A maturidade do pulmão fetal pode ser avaliada por mensuração da razão lecitina:esfingomielina no líquido amniótico. Se houver um problema em potencial, a mãe poderá ser tratada com um glicocorticoide para acelerar a maturação do pulmão fetal. A SARA também é vista em adultos cujas células epiteliais tipo II foram destruídas como resultado do uso de drogas imunossupressoras ou certos agentes quimioterápicos.

ESFINGOLIPÍDIOS

Estrutura e biossíntese de esfingosina

Os esfingolipídios são um grupo complexo de lipídios anfipáticos e polares. Eles são formados em uma estrutura central de cadeia longa de amino álcool esfingosina, que é formada por uma descarboxilação oxidativa e por condensação de palmitato com serina. Em todos os esfingolipídios, o ácido graxo de cadeia longa é aderido ao grupamento amino da esfingosina em uma ligação amida (Fig. 27.8). Em razão da estabilidade alcalina das amidas, comparada aos ésteres, os esfingolipídios são insaponificáveis, o que facilita sua separação dos gilcerofosfolipídios álcali lábeis.

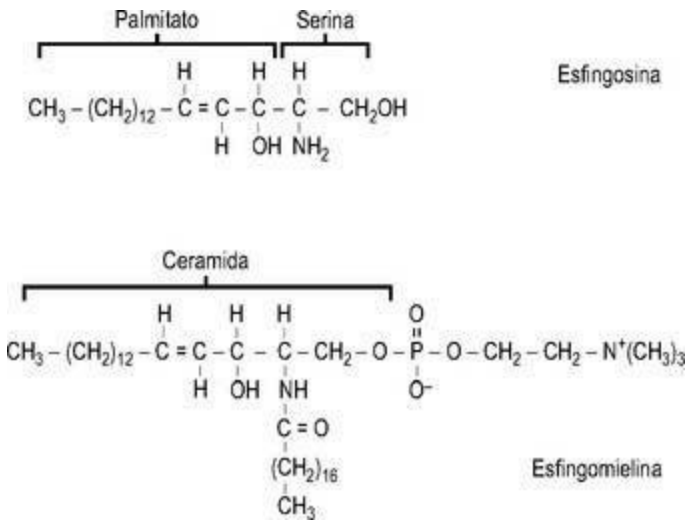


Fig. 27.8 Estruturas da esfingosina e esfingomielina.

ÂNCORAS DE MEMBRANA: GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL

O fosfatidilinositol é um componente integral da estrutura glicosilfosfatidilinositol (GPI), que ancora várias proteínas da membrana plasmática (Fig. 27.7). Em contrapartida com outros fosfolipídios de membrana, incluindo a maioria dos fosfatidilinositol de membrana, o GPI tem uma cadeia glicana contendo glicosamina e manose aderidos ao inositol. A etanolamina conecta o GPI-glicano ao carboxiterminal da proteína. Muitas proteínas de membrana de células eucarióticas são ancoradas por uma estrutura GPI, incluindo a fosfatase alcalina e a acetilcolinesterase, as quais possuem importante papel na mineralização óssea e transmissão nervosa, respectivamente. Diferentemente das proteínas integrais ou periféricas de membrana, as proteínas ancoradas por GPI podem ser liberadas da superfície celular pela fosfolipase C em resposta a processos regulatórios.

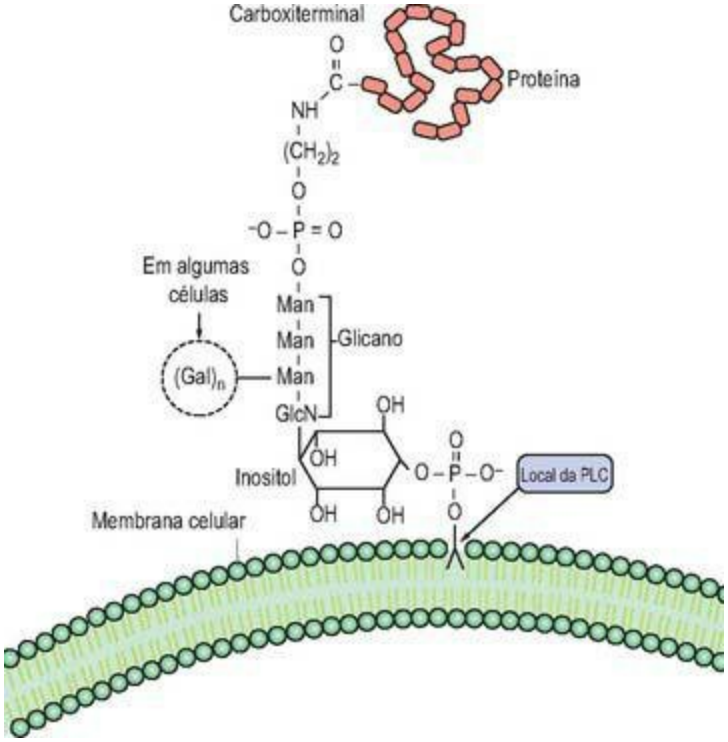


Fig. 27.7 Estrutura da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e sua adesão às proteínas. Gal, galactose; GlcN, glicosamina; Man, manose; PLC, fosfolipase C.

ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE VARIÁVEL DE TRIPANOSSOMAS

O parasita tripanossoma que causa a doença do sono, o *Tripanosoma brucei*, tem uma proteína chamada antígeno de superfície variável ligada à sua superfície celular por uma âncora de GPI. Este antígeno de superfície variável desencadeia a formação de anticorpos específicos no hospedeiro, e estes anticorpos podem atacar e matar o parasita. Entretanto, alguns dos parasitas invadem a barreira imune por desprender este antígeno, como se eles fossem uma camada removível.

Comentário. Os tripanossomas e alguns outros patógenos são capazes de desprender seus antígenos de superfície porque têm uma enzima, a fosfolipase C, que cliva a âncora de GPI na ligação fosfato-diacilglicerol, liberando o componente proteína-glicano no líquido externo. As células sobreviventes rapidamente fazem uma nova cobertura com uma estrutura antigênica diferente que não será reconhecida pelo anticorpo. Com certeza, essa nova cobertura desencadeará a formação de novos anticorpos específicos, mas o parasita pode desprender sua cobertura novamente, e então, em uma sequência randômica, invadir o sistema imune hospedeiro.

DEFEITOS NA ANCORAGEM DE GPI ASSOCIADOS A DOENÇA GENÉTICA: HEMOGLOBINÚRIA NOTURNA PAROXISMAL

A hemoglobinúria noturna paroxismal (PNH) é uma desordem hematológica complexa caracterizada por anemia hemolítica, tromboses venosas em locais pouco comuns e hematopoese deficiente. O diagnóstico da doença é baseado em uma incomum suscetibilidade das células vermelhas do sangue à ação hemolítica do complemento (Cap. 38), porque as células vermelhas de

pacientes com PNH são carentes de várias proteínas envolvidas na regulação da ativação do complemento na superfície celular.

Comentário. Uma dessas proteínas de superfície celular é o fator acelerador *decay*, uma proteína ancorada por GPI que inativa o complexo hemolítico formado durante ativação do complemento; na sua ausência, há aumento de hemólise. Existem diversos variantes genéticos da PNH. Um desses envolve um defeito na GlcNAc transferase que adiciona *N*-acetilglicosamina ao motivo inositol do fosfatidilinositol, o primeiro passo na formação da âncora de GPI (Fig. 27.7).

A síntese da esfingosina, base dos esfingolipídios, envolve a condensação do palmitoil-CoA com uma serina, na qual o carbono-1 da serina é perdido como dióxido de carbono. O produto dessa reação é convertido em várias etapas em esfingosina, que é então N-acetilada para formar ceramida (N-acilesfingosina). A ceramida (Fig. 27.10) é a precursora e a estrutura dorsal de ambos, esfingomielina e glicofosfolipídios.

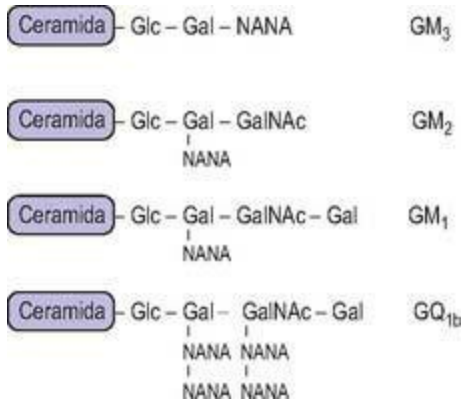


Fig. 27.10 Estruturas gerais dos gangliosídeos. Glc, glicose; Gal, galcatose; NANA, ácido *N*-acetil neuramínico; GalNAc, *N*-acetil galactosamina.

Esfingomielina

A esfingomielina (Fig. 27.8) é encontrada nas membranas plasmáticas, organelas subcelulares, retículo endoplasmático e mitocôndrias. Ela compreende cerca de 5%-20% dos fosfolipídios totais na maioria dos tipos celulares, e é majoritariamente localizada na membrana plasmática. A esfingomielina é o único esfingolipídio que contém fósforo, e é o maior fosfolipídio da bainha de mielina dos nervos. O grupamento fosfocolina na esfingomielina é transferido para o grupamento hidroxil terminal da esfingosina, por uma reação de transesterificação com uma fosfatidilcolina. A composição de ácidos graxos varia, mas os ácidos graxos de cadeia longa são mais comuns, incluindo os ácidos lignocérico (24:0), cerebrônico (2-hidroxilignocérico) e nervônico (24:1).

Glicolipídios

Os esfingolipídios contendo açúcares covalentemente ligados são conhecidos como glicoesfingolipídios ou glicolipídios. Assim como os glicoconjugados em geral, a estrutura das cadeias oligossacarídeas é bastante variável. Além disso, a distribuição da glicosiltransferase e do conteúdo de glicoesfingolipídios das células varia durante o desenvolvimento e em resposta aos processos regulatórios.

Os glicolipídios podem ser classificados em três principais grupos: cerebrosídeos, sulfatídeos e gangliosídeos. Em todos esses componentes, o grupamento cabeça polar, incluindo os açúcares, é unido à ceramida por uma ligação glicosídica no grupamento hidroxil terminal da esfingosina. A Figura 27.9 ilustra a estrutura e a biossíntese de alguns dos glicolipídios mais simples. Os cerebrosídeos são glicolipídios contendo açúcares neutros e amino. Glico e galactocerebrosídeo (glicosil e galactosil ceramida) são os menores dessa classe de compostos e servem como núcleo para a elaboração de mais estruturas complexas. Os sulfatídeos são formados pela adição de sulfato por um doador de sulfato, o 3′-fosfoadenosina-5′-fosfossulfato (PAPS) (Fig. 27.4), rendendo, por exemplo, galactocerebrosídeo-3-sulfato. Finalmente, os glicolipídios contendo ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico, NANA) são denominados gangliosídeos.

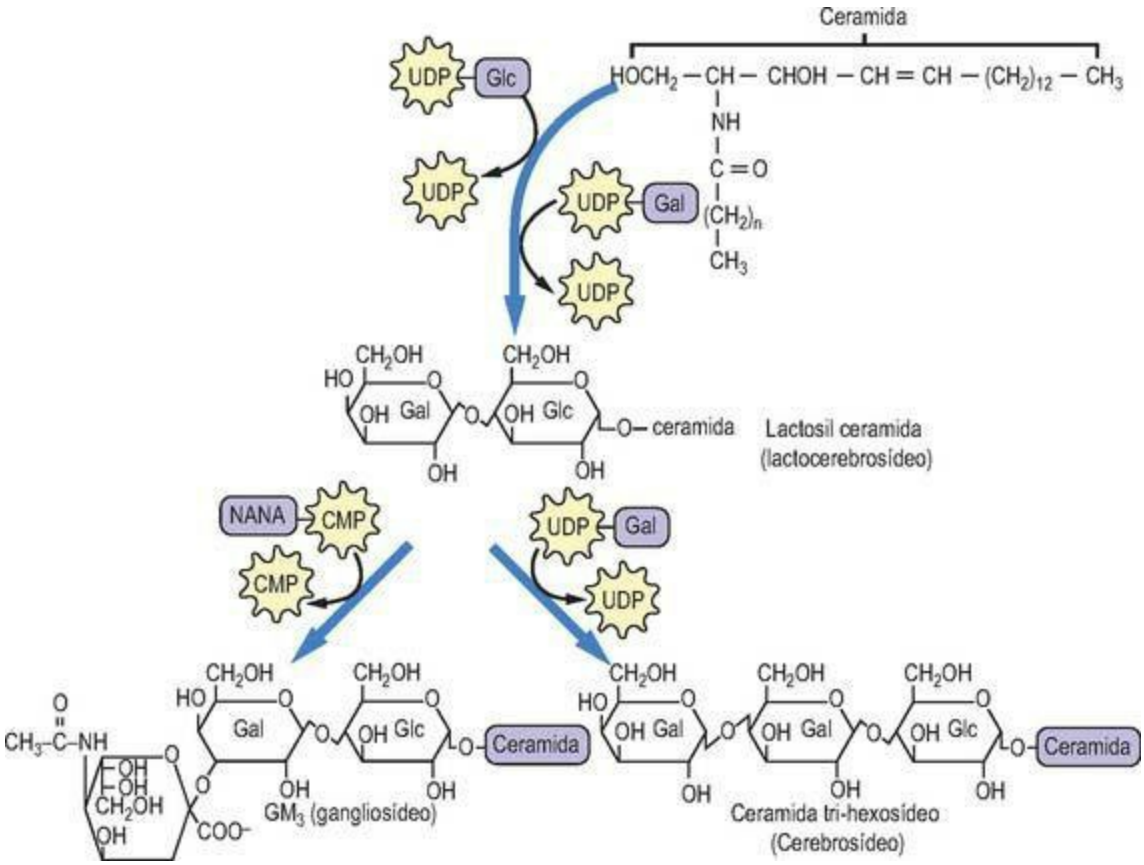


Fig. 27.9 Um esboço das reações das transferases para elongação dos glicolipídios e formação dos gangliosídeos.

Estrutura e nomenclatura dos gangliosídeos

O termo “gangliosídeo” se refere a glicoplipídios que foram originalmente identificados em altas concentrações nas células ganglionares do sistema nervoso central. Nas células do sistema nervoso em geral, mais de 50% do ácido siálico presente nas células está nos gangliosídeos. Os gangliosídeos também são encontrados nas superfícies de membrana das células da maioria dos tecidos extraneurais, mas nesses tecidos eles contêm menos que 10% do ácido siálico total.

A nomenclatura usada para identificar os vários gangliosídeos é baseada no número de resíduos de ácido siálico contidos na molécula e na sequência de carboidratos (Fig. 27.10). GM se refere ao gangliosídeo com um único ácido siálico (mono), enquanto GD, GT e GQ podem indicar dois, três e quatro resíduos de ácido siálico na molécula, respectivamente. O número depois de GM, por exemplo GM_1, se refere à estrutura do oligossacarídeo. Estes números foram derivados da mobilidade relativa dos glicolipídios em cromatogramas de camada fina; o maior dos gangliosídeos, GM_1, migra mais lentamente.

DOENÇAS DO ARMAZENAMENTO LISOSSOMAL RESULTANTE DE DEFEITO NA DEGRADAÇÃO DE GLICOLIPÍDIOS

Os oligossacarídeos complexos nos glicolipídios são montados com um resíduo de açúcar de cada vez no aparelho de Golgi e são degradados de maneira similar, passo a passo, por uma série de exoglicosidases nos lisossomos (Fig. 27.11). Defeitos na degradação sequencial dos glicolipídios levam a uma série de doenças de armazenamento lisossomal, conhecidas como cerebrosidoses e gangliosidoses (Tabela 27.1). Essas doenças são hereditárias autossômicas recessivas. Os heterozigotos são assintomáticos, indicando que uma única cópia do gene para uma enzima funcional é suficiente para um *turnover* aparentemente normal de glicolipídios. Como na doença de célula-I (quadro da pág. 364), as glicolipidoses são caracterizadas pelo acúmulo de material não digerido em corpos de inclusão nas células.

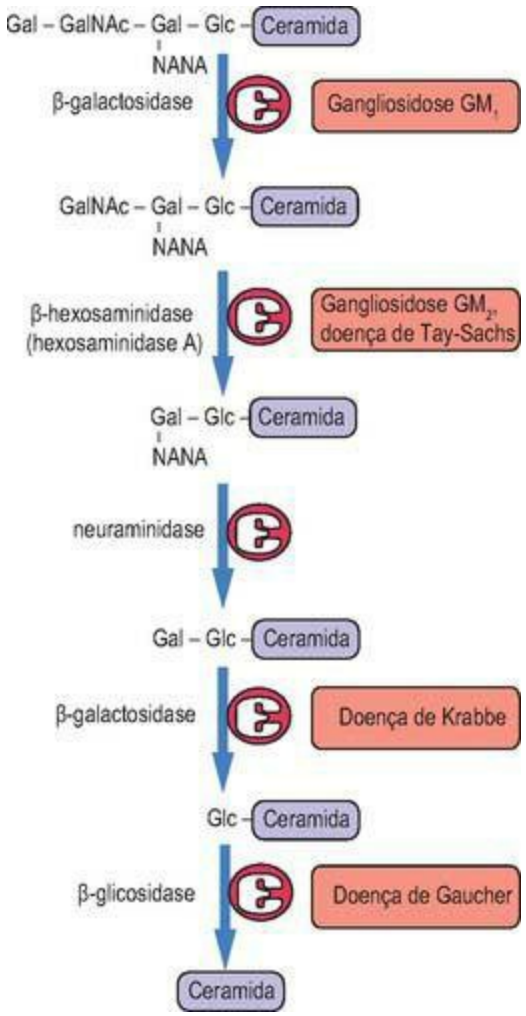


Fig. 27.11 Via lisossomal de *turnover* (degradação) de gangliosídeo GM_1 em células humanas. Várias enzimas podem estar ausentes em doenças de armazenamento de lipídios específicas, como indicado na Tabela 27.1. Gal, galactose; GalNAc, *N*-acetil galactosamina; Glc, glicose; NANA, ácido *N*-acetil neuramínico.

Tabela 27.1 Algumas doenças de armazenamento de lipidios.

Doença	Sintomas	Produto armazenado mais importante	Enzima deficiente
Tay-Sachs	cegueira, retardo mental, morte entre o 2° e 3° ano	GM_2 gangliosídeo	hexosaminidase A
Gaucher	fígado e baço aumentados, retardo mental na infância	glicocerebrosídeo	β-glicosidase
Fabry	erupções na pele, falha renal, dor nas extremidades inferiores	ceramida triexosídeo	α-galactosidase
Krabbe	fígado e baço aumentados, retardo mental	galactocerebrosídeo	β-galactosidase

CEREBROSIDOSES E GANGLIOSIDOSES

A doença Tay-Sachs é uma gangliosidose na qual o GM_2 se acumula como resultado da ausência de uma hexosaminidase A (Fig. 27.11). Indivíduos com essa doença geralmente têm retardo mental e cegueira, e morrem entre 2 e 3 anos de idade. A doença de Fabry é uma cerebrosidose resultante da deficiência de α-galactosidase e acúmulo de ceramida triexosídeo (Fig. 27.11). Os sintomas da doença de Fabry são erupções na pele, falha dos rins e dor nas extremidades inferiores. Pacientes com essa condição se beneficiam com transplantes renais e geralmente vivem do início ao meio da vida adulta. A maioria dessas doenças de armazenamento lisossomal aparece de várias formas (variantes), resultantes de diferentes mutações no genoma. Algumas doenças de armazenamento lisossomal e algumas variantes são mais graves e debilitantes que outras. Embora as doenças de armazenamento lisossomal sejam relativamente raras, elas têm um impacto maior sobre a nossa compreensão da função e importância dos lisossomos.

Comentário. Quando as células morrem, as biomoléculas, incluindo glicoesfingolipídios e glicoproteínas, são degradadas aos seus componentes individuais. A Figura 27.11 apresenta a via de degradação de um gangliosídeo, como o GM_1 nos lisossomos. Diversas doenças lisossomais resultam da ausência de uma glicosidase essencial (Tabela 27.1). As esfingolipidoses são caracterizadas por acúmulo lisossomal do substrato da enzima ausente, interferindo com a função lisossomal normal no *turnover* de biomoléculas.

DOENÇA DE GAUCHER: UM MODELO PARA A TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA

A doença de Gaucher é a doença de armazenamento lisossomal na qual os indivíduos atingidos têm deficiência da enzima glicocerebrosidase. Essa enzima remove o açúcar final da ceramida, permitindo que a porção de lipídios seja posteriormente degradada nos lisossomos. A doença é caracterizada por hepatomegalia e neurodegeneração, mas existem variantes brandas que são aceitas para o tratamento por terapia de reposição enzimática.

Para o tratamento da doença de Gaucher, a β-glicosidase exógena foi direcionada, com sucesso, aos lisossomos de macrófagos usando um receptor de manose de superfície celular. A fim de realizar isso com sucesso, foi necessário produzir uma enzima recombinante de reposição com cadeias *N*-glicano contendo resíduos terminais de manose. Isso foi feito clivando-se os glicanos da enzima

produzida nas células de mamíferos com uma combinação de sialidase (neuraminidase), β-galactosidase e β-hexosaminidase para clivar as cadeias complexas no centro da manose. Uma glicosidase recombinante alternativa foi produzida em sistema de células de inseto infectadas por baculovírus. Nesse caso, a enzima tem um oligossacarídeo rico em manose que não é processado em cadeias complexas. As enzimas recombinantes são administradas por intravenosa. O sucesso no uso de glicocerebrosidase para o tratamento da doença de Gaucher tem estimulado o desenvolvimento de outras hidrolases lisossomais para o tratamento das doenças de armazenamento lisossomal (ver também Leituras sugeridas).

DOENÇA DE FABRY (INCIDÊNCIA 1 EM 100.000)

Um homem de 30 anos de idade apresentou proteinúria em seu exame médico. Ele tem sido examinado há muito tempo, desde cerca dos 10 anos de idade, com dores de cabeça, vertigem e dor aguda em seus braços e pernas. Nenhum diagnóstico foi feito e ele cresceu acostumado com esses problemas. Um médico examinou cuidadosamente seu períneo e escroto, identificando angioqueratoma pequeno, elevado e vermelho.

Comentário. Esse homem foi diagnosticado com doença de Fabry, que geralmente leva anos até que o diagnóstico seja confirmado por dosagem da atividade da α-galactosidase A. Sua segurança diminuiu assim como é esperado que a proteinúria progrida para a falência renal dentro de 15 anos. As principais deposições endoteliais de um cerebrosídeo (ceramida triexosídeo) ocorrem nos rins (levando à proteinúria e falência renal), no coração e cérebro (levando ao infarto do miocárdio e a um acidente vascular cerebral), e em torno dos vasos sanguíneos que suprem os nervos (levando a uma dolorosa parestesia). A terapia de reposição com enzimas recombinantes parece limpar os cerebrosídeos depositados, e estudos iniciais sugerem que a função renal é mantida.

ANTÍGENOS DO GRUPO SANGUÍNEO ABO

Transfusões sanguíneas repõem a capacidade de o sangue carrear oxigênio nas pessoas que sofreram de perda de sangue ou anemia (Cap. 5). O termo "transfusão sanguínea" é um tanto equivocado, porque envolve somente a infusão de células vermelhas lavadas e preservadas. As membranas das células vermelhas do sangue contêm vários grupamentos antígenos do sangue, dos quais o sistema do grupo sanguíneo ABO é o mais compreendido e estudado. Os antígenos desse grupo têm um precursor em comum, chamado de substância H (Fig. 27.12), e um indivíduo pode ter sangue do tipo A, tipo B, tipo AB ou tipo O. Indivíduos com células tipo A desenvolvem anticorpos naturais em seu plasma que são direcionados contra e se aglutinarão com as células vermelhas do sangue tipo B ou tipo AB, enquanto as células vermelhas com o tipo B desenvolvem anticorpos contra a substância A e se aglutinarão com células do tipo A e tipo AB. Pessoas com o sangue do tipo AB não têm anticorpos contra A e nem contra B, e são chamadas "receptores universais", visto que podem ser transfundidas com células de qualquer tipo sanguíneo. Indivíduos com sangue do tipo O têm somente a substância H, nem A e nem B, em suas células vermelhas do sangue, e são "doadores universais", visto que as células vermelhas do sangue não são aglutinadas com anticorpos contra A ou B; podem aceitar sangue somente de um doador do tipo O.

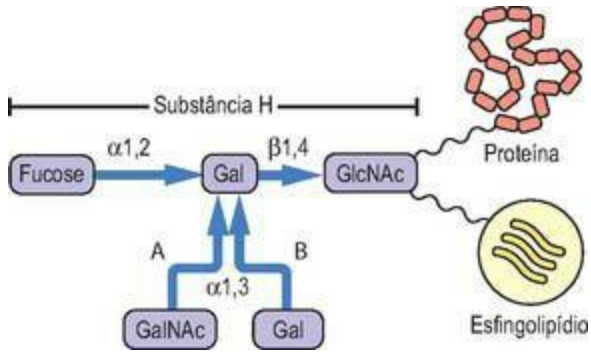


Fig. 27.12 Relação entre as substâncias H, A e B dos grupos sanguíneos. O oligossacarídeo terminal é ligado por meio de outros açúcares a proteínas e lipídios das membranas das células vermelhas. GlcNAc, *N*-acetil glicosamina; GalNAc, *N*-acetil galactosamina; Gal, galactose.

Os antígenos do grupo sanguíneo ABO são carboidratos complexos presentes como componentes de glicoproteínas ou glicoesfingolipídios de membranas das células vermelhas. O lócus H codifica uma fucosiltransferase. Indivíduos com sangue tipo A têm, além da substância H, um gene A que codifica uma GalNAc transferase específica que adiciona GalNAc α1,3 ao resíduo de galactose da substância H para formar o glicolipídio tipo A. Indivíduos com sangue tipo B têm um gene que codifica a galactosil transferase, que adiciona α1,3 ao resíduo de galactose da substância H, para formar o glicolipídio tipo B. Indivíduos com sangue tipo AB têm ambas, a GalNAc e a Gal transferase, e suas células vermelhas do sangue contêm ambas as substâncias A e B. Aqueles com sangue tipo O e com somente a substância H em seus glicoesfingolipídios das células vermelhas não fazem qualquer enzima. Enzimas como as α-galactosidase do grão de café podem remover a galactose das células vermelhas do tipo B, um caminho que está sendo testado para aumentar o suprimento de células vermelhas tipo O (doador universal).

Os antígenos ABO estão presentes na maioria das células do corpo, mas são associados aos grupos antigênicos do sangue por causa de sua associação de reações de transfusão. A reação de transfusão é resultado da reação dos anticorpos do hospedeiro com as células vermelhas transfundidas, resultando em hemólise mediada pelo complemento (Cap. 38). Enquanto a reação de transfusão demonstra o papel dos carboidratos no reconhecimento de células vermelhas estranhas, a função fisiológica das substâncias do grupo sanguíneo não é clara. Pessoas com um genótipo O são geralmente tão saudáveis quanto aquelas com genótipo A ou B. Entretanto, existe alguma evidência que fenótipos específicos podem conferir resistência diferencial à doença; por exemplo, pessoas com sangue tipo A e O parecem ser mais suscetíveis à varíola e à cólera, respectivamente.

OUTRAS SUBSTÂNCIAS DOS GRUPOS SANGUÍNEOS

Os antígenos do grupo sanguíneo Lewis correspondem a um grupo de estruturas glicanas fucosiladas. O antígeno Lewis A (Lewis^a) é sintetizado pela fucosiltransferase, que transfere um resíduo de fucose ao resíduo de GlcNAc na cadeia glicana (Fig. 27.13); enquanto o antígeno Lewis^b é sintetizado pela ação associada de uma segunda fucosiltransferase, a qual transfere a fucose ao resíduo de galactose na mesma cadeia glicana. Note a similaridade dessas estruturas com o antígeno sialil Lewis-X na Figura 26.9 e os antígenos ABO na Figura 27.12. Existem 13 fucosiltransferases no genoma humano. As mudanças na fucosilação dos glicanos são associadas à diferenciação, desenvolvimento, carcinogênese e metástase.

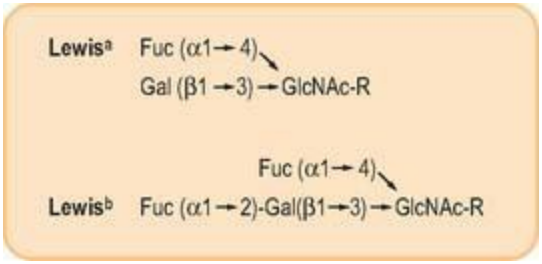


Fig. 27.13 Estrutura dos antígenos do grupo sanguíneo de Lewis.

GLICOLIPÍDIOS SÃO locais LIGANTES PARA BACTÉRIAS E TOXINAS BACTERIANAS

As bactérias são envolvidas por proteínas chamadas de adesinas que reconhecem e interagem com estruturas de carboidratos específicos nos glicolipídios, glicoproteínas e até nos proteoglicanos. Muitas dessas adesinas bacterianas são subunidades proteicas do pili, estruturas semelhantes a cabelo na superfície da bactéria. Os domínios de reconhecimento de carboidrato são geralmente localizados no ápice do pili. A maioria das bactérias também possui diferentes tipos de adesinas na sua superfície, cada uma contendo diferentes locais de reconhecimento de carboidratos, e essas adesinas definem os tipos de tecidos suscetíveis que a bactéria pode se ligar e talvez invadir. Cada ligante de adesina individual é de baixa afinidade e a ligação é fraca, mas existem muitas cópias de uma dada adesina na superfície bacteriana e elas se agrupam; assim, a interação total é polivalente ao invés de monovalente e a ligação torna-se bastante forte.

A interação da adesina com seu receptor pode ativar a via de transdução do sinal e levar a eventos que são fundamentais para a colonização e talvez infecção. Diversas adesinas bacterianas almejam oligossacarídeos contendo Galβ1,4Glc. Essa é a estrutura do dissacarídeo que é encontrado no glicolipídio lactosilceramida nos animais, e a sua estrutura pode estar presente como tal, ou pode estar coberta com outros açúcares, como nos antígenos do grupo sanguíneo ABO. Porém, algumas bactérias secretam enzimas (glicosidases) que podem remover esses açúcares terminais para expor a estrutura da lactose para se ligar às suas adesinas. As células epiteliais do intestino grosso expressam lactosilceramida, enquanto as células de revestimento do intestino delgado não expressam

esse glicolipídio. Como resultado, *Bacterioides, Clostridium, Escheria coli* e *Lactobacillus* colonizam somente o intestino grosso sob condições normais.

Além dos ligantes bacterianos, diversas toxinas que são secretadas pelas células bacterianas também se ligam a glicolipídios específicos. A melhor estudada dessas toxinas é a toxina da cólera, isto é, a toxina produzida pelo *Vibrio cholerae*, a qual se liga ao G-M_1 (quadro). A toxina da *Shigella dysenteriae* também se liga às células do intestino grosso, mas ela reconhece um glicolipídio diferente, nesse caso um cerebrosídeo, Galα1-4Galβ-ceramida ou Galα1-4Galβ1-4Glcβ-ceramida. Esses dois exemplos mostram bem claramente como sutis mudanças nas estruturas das moléculas de carboidrato podem ser reconhecidas por diferentes proteínas, e porque a natureza selecionou moléculas de carboidratos como provedores de reconhecimento químico de informação. Existem outras toxinas, como a toxina tetânica produzida pelo *Clostridium tetani* ou a toxina botulínica pelo *Clostridium botulinim*, que também se ligam aos glicolipídios nas membranas das células nervosas. Essas toxinas reconhecem glicolipídios muito mais complicados. Por exemplo, a toxina tetânica se liga ao glicolipídio chamado G_{1b}gangliosídeo.

RECEPTOR DE GANGLIOSÍDEO PARA TOXINA DA CÓLERA

Os cerebrosídeos e globosídeos contendo galactose nas membranas plasmáticas das células epiteliais intestinais são locais ligantes de bactérias. Os glicolipídios parecem ajudar na retenção da flora intestinal normal (simbiontes) no intestino, mas inversamente, acredita-se que esses e outros glicolipídios ligantes de bactérias patogênicas facilitam a infecção das células epiteliais. A diferença entre as bactérias simbiontes e patogênicas depende, em parte, de sua capacidade de secretar toxinas ou de penetrar nas células do hospedeiro após reação de ligação.

As células da mucosa intestinal contêm gangliosídeos GM_1 (Fig. 27.10). Esses gangliosídeos servem como receptor, no qual a toxina da cólera se liga em uma primeira etapa de sua penetração nas células intestinais. A toxina da cólera é uma proteína hexamérica secretada pela bactéria *Vibrio cholerae*. A proteína é composta de uma subunidade A e cinco subunidades B. A proteína se liga aos gangliosídeos por múltiplas interações por meio das subunidades B, que habilitam a subunidade A a entrar na célula e ativar a adenilato ciclase na superfície interna da membrana. O AMP cíclico formado estimula então as células intestinais a exportar íons cloreto, levando a uma diarreia osmótica, desequilíbrio eletrolítico e desnutrição. A cólera permanece ainda hoje como fator número um responsável por mortes de crianças em todo o mundo.

Os antígenos do grupo sanguíneo P são glicoesfingolipídios presentes nas células vermelhas e em outros tecidos. Novamente, os glicanos nesse grupo sanguíneo são sintetizados por uma ação sequencial de distintas glicosiltransferases, mas sabe-se relativamente pouco sobre as enzimas e os genes envolvidos. A função fisiológica dos grupos sanguíneos não é conhecida, mas os antígenos P estão associados à fisiopatologia de infecções no trato urinário e infecções por parvovírus. As linhagens uropatogênicas de *E. coli* expressam lecitinas que se ligam ao motivo de Galα1,4Gal dos antígenos P^k e P_1. Claramente, mais estudos são necessários para compreender a genética e a bioquímica desses e outros antígenos dos grupos sanguíneos, bem como seus papéis na fisiologia e na doença.

Resumo

Os lipídios polares complexos são componentes essenciais de todas as membranas celulares. Os fosfolipídios são as maiores estruturas lipídicas de todas as membranas, mas eles também têm propriedades funcionais importantes, como surfactantes, cofatores de enzimas de membrana e como componentes do sistema de transdução de sinal. A rota primária para a biossíntese de novo de fosfolipídios envolve a ativação de um dos componentes (ou DAG ou o grupamento cabeça) com CTP para formar um intermediário de alta energia, como CDP-diglicerídeo ou CDP-colina. Além disso, existem reações de troca e modificação pelas quais as células animais interconvertem vários fosfolipídios. O outro maior tipo de lipídio de membrana são os esfingolipídios, incluindo a esfingomielina e vários glicolipídios. Esses lipídios funcionam como receptores para reconhecimento célula-célula e interações, e como locais ligantes de bactérias simbiontes e patogênicas, e também de vírus. Além disso, várias estruturas de carboidratos nos glicolipídios de membranas das células vermelhas também são determinantes antigênicos responsáveis pelo tipo sanguíneo ABO e outros. Os glicoesfingolipídios são degradados nos lisossomos por uma sequência complexa de reações que envolvem a remoção gradativa de açúcares da porção final não reduzida das moléculas, com uma hexoglicosidase lisossomal específica envolvida em cada passo. Diversas doenças hereditárias de armazenamento lisossomal resultam de defeitos na degradação de esfingolipídios.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Descreva o papel dos plasmalogênios *versus* diacilglicerol fosfolipídios nas estruturas de membranas celulares e sua função.

2. Discuta os desafios no desenvolvimento de uma vacina para proteger contra as tripanossomíases.

3. Revise o método terapêutico corrente para o diagnóstico e tratamento da síndrome da insuficiência respiratória aguda (SARA).

4. Revise os mecanismos de interação patógeno-hospedeiro, focando no papel das lecitinas na patogenicidade microbiana.

Leituras sugeridas

Allende MM, Proia RL. Lubricating cell signalling pathways with gangliosides. *Curr Opin Struct Biol*. 2002;12:587-592.

Brady RO. Enzyme replacement for lysosomal diseases. *Annu Rev Med*. 2006;57:283-296.

Dowhan W. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem*. 1997;66:199-232.

Grabowski G. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gauchers disease. *Lancet*. 2008;372:1263-1271.

Hellstrom U, Hallberg EC, Sandros J, Rydberg L, Backer AE. Carbohydrates act as receptors for the periodontitis-associated bacterium *Porphyromonas gingivalis*: a study of bacterial binding to glycolipids. *Glycobiology*. 2004;14:511-519.

Hooper LV, Gordon JL. Glycans as legislators of host–microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology*. 2001;11:1R-10R.

Lafont F, van der Goot FG. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol*. 2005;7:613-620.

Sites

Grupos sanguíneos Grupos sanguíneos. www.bloodbook.com/type-sys.html.

Doença de Gaucher. www.ninds.nih.gov/health_and_medical/disorders/gauchers_doc.htm.

Hemoglobinúria Hemoglobinúria Paroximal Noturna. www.emedicine.com/med/topic2696.htm.

Doença de Tay-Sachs. www.ninds.nih.gov/health_and_medical/disorders/taysachs_doc.htm.

A Matriz Extracelular

G.P. Kaushal

A.D. Elbein

W.M. Carver

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a composição, a estrutura e a função da matriz extracelular (MEC) e dos seus componentes, incluindo o colágeno, as proteínas não colágenas e os proteoglicanos.
- Delinear os papéis funcionais da MEC nos tecidos.
- Delinear a sequência de etapas na biossíntese e na modificação pós-traducional do colágeno e da elastina, incluindo a estrutura e a síntese de ligações cruzadas.
- Descrever as vias de biossíntese e a reciclagem dos proteoglicanos.
- Descrever a patologia das doenças genéticas resultantes de erros na síntese ou na reciclagem dos componentes da MEC.

INTRODUÇÃO

A matriz extracelular (MEC) é uma complexa rede de macromoléculas secretadas localizadas no espaço extracelular. Historicamente, a MEC tem sido descrita simplesmente como a fornecedora de um suporte tridimensional para a organização dos tecidos e órgãos; entretanto, torna-se cada vez mais claro que a matriz extracelular possui um papel central na regulação dos processos celulares básicos, incluindo a proliferação, diferenciação, migração e até mesmo a sobrevivência celular. A rede macromolecular da MEC é formada por colágenos, elastina, glicoproteínas e proteoglicanos que são secretados por uma variedade de tipos celulares, incluindo os fibroblastos, os condrócitos e os osteoblastos. Os componentes da MEC estão em contato íntimo com suas células de origem e formam um leito gelatinoso tridimensional, no qual as células se desenvolvem. As proteínas da MEC também estão ligadas à superfície das células, por isso tais proteínas transmitem sinais mecânicos resultantes do estiramento e da compressão dos tecidos. A relativa abundância, distribuição e organização molecular dos componentes da MEC variam muito entre os tecidos, afetando acentuadamente as propriedades estruturais e funcionais dos mesmos. As mudanças nessas características da MEC estão associadas às doenças crônicas, como a artrite, aterosclerose, câncer e a fibrose.

COLÁGENOS

Os colágenos são as principais proteínas na MEC

Os colágenos constituem uma família de proteínas que compreende cerca de 30% do total de massa proteica do corpo. Como componentes estruturais primários da MEC nos tecidos conjuntivos, os colágenos possuem um importante papel na arquitetura e integridade tecidual, bem como na mediação de uma grande variedade de interações célula-célula e célula-matriz. Até o presente, mais de 25 tipos diferentes de colágenos já foram identificados. Eles são compostos por cadeias peptídicas relacionadas, porém distintas, e variam consideravelmente na sua distribuição, organização e função nos tecidos.

Estrutura em tripla hélice dos colágenos

Os colágenos são proteínas heterotriméricas compostas por três cadeias peptídicas individuais. A principal característica estrutural do colágeno é a sua estrutura em tripla hélice, formada pelo enovelamento de três cadeias polipeptídicas. Estas cadeias variam no seu tamanho, chegando até 1.000 aminoácidos por cadeia. A análise por difração de raio X indica que três cadeias em hélice orientadas para a esquerda são enroladas umas nas outras, como em uma corda, para formar a estrutura em super-hélice (Fig. 28.1). A hélice com orientação para a esquerda é mais extensa que a α-hélice das proteínas globulares, apresentando um aumento de aproximadamente duas vezes por giro e apenas três, em vez de 3,6 aminoácidos por giro. Todo terceiro aminoácido é glicina, porque apenas este aminoácido com uma menor cadeia lateral encaixa-se no apertado eixo central. A sequência repetitiva característica do colágeno é GLy-X-Y, na qual X e Y podem ser qualquer aminoácido, porém mais frequentemente X é prolina e Y é hidroxiprolina. Por causa de sua rotação restrita e volume, a prolina e a hidroxiprolina conferem rigidez à hélice. As intra e intercadeias da hélice são estabilizadas por pontes de hidrogênio, predominantemente entre os grupos peptídicos NH e C=O. As cadeias laterais dos aminoácidos X e Y apontam para fora da hélice, e assim estão na superfície da proteína, onde formam interações laterais com outras triplas hélices ou proteínas.

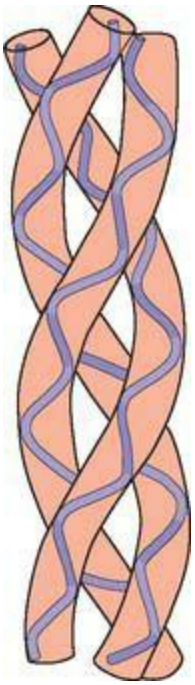


Fig. 28.1 Estrutura tridimensional do colágeno. As cadeias monoméricas do colágeno assumem uma estrutura terciária em α-hélice voltada para a esquerda. Elas, então, se associam para formar uma estrutura quaternária em super-hélice com três filamentos e orientada para a direita.

Tipos de colágeno

Alguns dos tipos de colágenos mais representativos estão listados na Tabela 28.1. A família de proteínas colagenosas pode ser dividida em dois tipos principais: os colágenos formadores de fibrila (fibrilares) e os colágenos não fibrilares.

Tabela 28.1 Membros da família do colágeno. Classificação e dis-tribuição dos diferentes tipos de colágeno.

Membros da família do colágeno		
Tipo	**Classe**	**Distribuição**
I	fibrilar	pele e tendão
II	fibrilar	cartilagem, cornea em desenvolvimento e humor vítreo
III	fibrilar	tecido conjuntivo extensível, p. ex., pele, pulmão e sistema vascular
IV	recde	membranas basais, rim e parede vascular
V	fibrilar	fígado, córnea e mucosa
VI	filamentos com domínios globulares	maioria dos teddos conjuntivos
IX	FACIT	cartilagem, humor vítreo
XI	formador de fibrila	cartilagem, osso, placenta
XII	FACIT	tendão embrionário, pele
XIII	com domínio transmembrana	amplamente distribuído
XIV	FACIT	pele fetal e tendões

FACIT, colágenos associados a fibrila com triplas hélices interrompidas.

Colágenos formadores de fibrila

Os colágenos formadores de fibrilas incluem os tipos I, II, III, V e XI (Tabela 28.1). As fibrilas colágenas podem ser formadas de uma mistura de diferentes colágenos fibrilares. Por exemplo, as fibrilas colágenas dérmicas são híbridas dos colágenos dos tipos I e III, e as fibrilas do estroma corneano são híbridas dos colágenos dos tipos I e IV. O colágeno do tipo I é o mais abundante colágeno fibrilar e ocorre em uma grande variedade de tecidos; outros possuem uma distribuição tecidual mais limitada (Tabela 28.1). O colágeno do tipo I e colágenos fibrilares relacionados formam associações de fibrilas bandeadas bem-organizadas e fornecem grande força de tensão à pele, tendões e ligamentos. Como mostrado, os colágenos são heterotriméricos, compostos por três cadeias peptídicas em α-hélice (Fig. 28.1). O colágeno heterotrimérico do tipo I é composto por duas cadeias α1 (I) e uma cadeia α2 (I). Cada uma dessas cadeias peptídicas contém cerca de 1.000 aminoácidos e apresenta um domínio estrutural em tripla hélice ao longo de quase todo o comprimento da molécula. As fibrilas de colágeno são formadas por associações laterais de triplas hélices em um alinhamento em "justaposição de um quarto", no qual cada molécula é deslocada cerca

de um quarto do seu comprimento em relação à molécula vizinha mais próxima (Fig. 28.2). O arranjo em "justaposição de um quarto" é responsável pela aparência bandeada das fibrilas de colágeno nos tecidos conjuntivos. As fibrilas são estabilizadas tanto por ligações covalentes quanto por ligações cruzadas intercadeias derivadas de resíduos de lisina (ver a seguir).

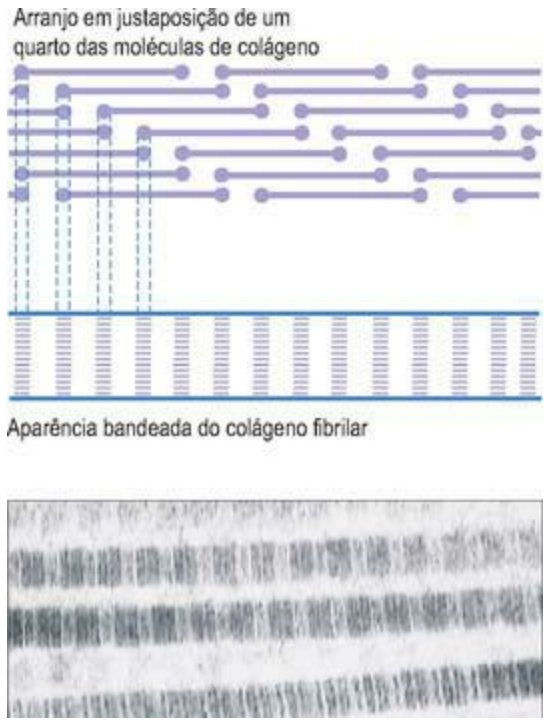


Fig. 28.2 Formação do arranjo em justaposição de um quarto das moléculas de colágeno em uma fibrila. A sobreposição regular das extremidades curtas, terminais não helicoidais, das cadeias do colágeno gera um padrão de bandeamento regular na fibra de colágeno.

(Micrografia eletrônica, Cortesia de Dr. Trevor Gray.)

Colágenos não fibrilares

Os colágenos não fibrilares constituem um grupo heterogêneo que contém segmentos em tripla hélice de comprimentos variáveis interrompidos por um ou mais segmentos não helicoidais (não colagenosos). Este grupo inclui os colágenos da membrana basal (família do tipo IV), colágenos associados a fibrilas com triplas hélices interrompidas (FACITs) e colágenos com domínios em tripla hélice múltiplos com interrupções, conhecidos como multiplexinas. Colágenos não fibrilares se associam a colágenos fibrilares, formando microfibrilas e estruturas em rede ou similares a malhas.

OSTEOGÊNESE IMPERFECTA (INCIDÊNCIA: 1 EM 30.000-50.000)

Um menino com 6 anos de idade foi atendido em um pronto-socorro com a tíbia e a fíbula quebradas durante um jogo de futebol. O pai dele, com 1,83 metro de altura, explicou que havia quebrado as pernas quatro vezes enquanto estava na escola. Os dentes do pai eram levemente transparentes e descoloridos.

Comentário. A osteogênese imperfecta (OI), também chamada de doença do osso frágil, é uma

doença congênita causada por múltiplos defeitos genéticos na síntese do colágeno do tipo I. Esta doença é caracterizada por ossos frágeis, pele delgada, dentes anormais e tendões fracos. A maioria dos indivíduos com esta doença possui mutações nos genes que codificam as cadeias de colágenos α1 (I) e α2 (I). Muitas dessas mutações são substituições de uma única base que convertem a glicina na sequência de repetição GLy-X-Y em aminoácidos maiores, impedindo o correto enovelamento das cadeias de colágeno em tripla hélice e a sua montagem para a formação das fibrilas de colágeno. A predominância do colágeno do tipo I nos ossos explica porque estas estruturas são predominantemente afetadas. Entretanto, há uma notável variabilidade clínica, caracterizada pela fragilidade óssea, osteopenia, variáveis graus de baixa estatura e deformidades esqueléticas progressivas. A forma mais comum de OI, com uma apresentação que algumas vezes é confundida com abuso infantil, possui um bom prognóstico, com a ocorrência das fraturas diminuindo após a puberdade, ainda que a redução geral da massa óssea garanta que os riscos continuem altos por toda a vida. Os pacientes frequentemente desenvolvem deficiência auditiva devido à osteosclerose, em parte por recorrentes fraturas dos estribos. As drogas chamadas de bifosfonatos (Cap. 25) inibem a atividade dos osteoclastos e com isso restringem a regeneração óssea normal, diminuindo a incidência das fraturas. Os estudos de acompanhamento em longo prazo encontram-se em andamento.

As membranas basais são camadas relativamente finas da MEC, encontradas na porção basal das células epiteliais; estas membranas circundam outros tipos celulares incluindo os miócitos, células de Schwann e adipócitos. A membrana basal apresenta inúmeras funções, que incluem a ancoragem das células no tecido conjuntivo adjacente e a filtração.

O colágeno do tipo IV é o principal componente estrutural de todas as membranas basais, nas quais constitui uma flexível trama. Este colágeno contém um domínio longo em tripla hélice interrompido por sequências não colagenosas curtas. Estas interrupções no domínio helicoidal bloqueiam a contínua associação de duas triplas hélices e as obrigam a encontrar outras parceiras, contribuindo assim para a formação de uma estrutura em treliça. No rim, a espessa membrana basal (100-200 nm de espessura) na porção basal das células endoteliais dos capilares glomerulares desempenha um papel essencial como um filtro macromolecular (Cap. 23). A rede de proteínas da MEC na membrana basal restringe a passagem de grandes moléculas do sangue para a urina. Além disso, a inclusão de proteoglicanos carregados negativamente (descritos a seguir neste capítulo) na membrana basal glomerular restringe a passagem de moléculas carregadas. Anormalidades no colágeno do tipo IV na membrana basal glomerular resultam em diversas doenças glomerulares, incluindo a síndrome de Goodpasture e a síndrome de Alport. A síndrome de Goodpasture é uma rara doença autoimune causada pela produção de anticorpos que especificamente se ligam ao colágeno do tipo IV das membranas basais. Esta condição leva a uma progressiva deterioração da função da membrana basal nos rins e algumas vezes no pulmão. A síndrome de Alport é resultante de mutações nas cadeias do colágeno do tipo IV que causam um defeito na montagem do molde de colágeno das membranas basais. Os sintomas de ambas as síndromes progridem do aparecimento de sangue na urina (hematúria) para a urina contendo proteína em excesso (proteinúria) e, por fim, para a falência renal.

Síntese e modificação pós-traducional dos colágenos

A síntese de colágeno começa no retículo endoplasmático rugoso (RER)

Após a síntese no RER, o nascente polipeptídio colágeno sofre extensa modificação. Primeiro no RER, posteriormente no aparelho de Golgi, e finalmente no espaço extracelular, onde é modificado em uma fibrila colágena extracelular madura (Fig. 28.3). Uma cadeia polipeptídica nascente, pré-pró-colágeno, é sintetizada inicialmente com uma sequência sinal hidrofóbica que facilita a sua ligação nos ribossomos do retículo endoplasmático (RE) e direciona a cadeia polipeptídica em crescimento até à luz do RE. A modificação pós-traducional da proteína começa com a remoção do peptídio sinal no RE, originando o pró-colágeno. Então, três diferentes hidroxilases adicionam grupos hidroxilas aos resíduos de prolina e de lisina, formando 3- e 4-hidroxiprolinas e δ-hidroxilisina. Estas hidroxilases requerem ácido ascórbico (vitamina C) como um cofator (Fig. 28.3, etapa 1). A deficiência de vitamina C leva ao escorbuto, como resultado das alterações na síntese e nas suas ligações cruzadas do colágeno (Cap. 11).

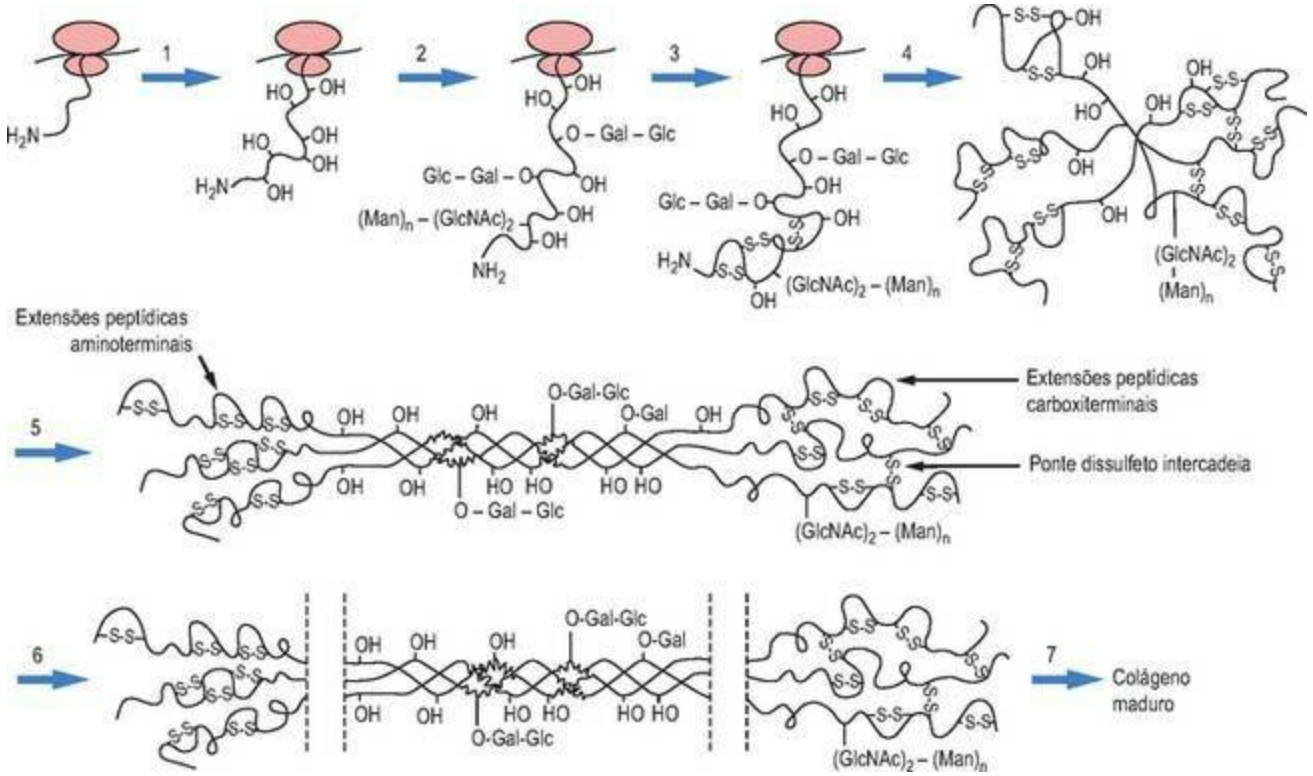


Fig. 28.3 Biossíntese e processamento pós-traducional do colágeno. O colágeno é sintetizado no RER e pós-traducionalmente modificado no aparelho de Golgi; depois é secretado, clivado nos seus peptídios de extensão, e finalmente é montado em fibrilas no espaço extracelular. (1) Hidroxilação dos resíduos prolina e lisina. (2) Adição dos oligossacarídeos *O*-ligados e *N*-ligados. (3) Formação de pontes dissulfeto intracadeias no *N*-terminal da cadeia polipeptídica nascente. (4) Formação dos dissulfetos intercadeias nos domínios *C*-terminais, que auxiliam no alinhamento das cadeias. (5) Formação do tropocolágeno solúvel com cadeia tripla e o transporte para as vesículas do Golgi. (6) Exocitose e remoção dos pró-peptídeos *N*- e *C*-terminais. (7) Estágios finais do processamento, incluindo associação lateral das triplas hélices, ligações cruzadas covalentes e a formação da fibra colágena. Gal, galactose; Glc, glicose; GlcNAc, *N*-acetilglicosamina; Man, manose.

A glicosilação *O*-ligada ocorre pela adição de resíduos de galactosil na hidroxilisina pela galactosil transferase; então, um dissacarídeo é formado pela adição de glicose na galactosil hidroxilisina pela glicosil transferase (Fig. 28.3, etapa 2). Estas enzimas possuem especificidade

restrita aos substratos hidroxilisina ou para a galactosil hidroxilisina, e estas glicosilam apenas aquelas sequências peptídicas que estão em domínios não colagenosos. A glicosilação *N*-ligada também ocorre em resíduos específicos de asparagina em domínios não fibrilares. Os colágenos não fibrilares, com uma grande extensão de domínios não helicoidais, são mais glicosilados que os colágenos fibrilares. Assim a extensão da glicosilação pode influenciar a estrutura da fibrila, interrompendo a formação da fibrila e promovendo as interações intercadeias necessárias para a estrutura em rede. Pontes de dissulfeto intra e intercadeias são formadas nos domínios C-terminais por uma proteína dissulfeto isomerase, facilitando a associação e o enovelamento das cadeias peptídicas em tripla hélice (Fig. 28.3, etapas 3-5). Neste estágio, o pró-colágeno ainda é solúvel e contém extensões não helicoidais adicionais nas suas extremidades *N*- e C-terminais.

O pró-colágeno é finalmente modificado em colágeno no aparelho de Golgi

Após a montagem em tripla hélice, o pró-colágeno é transportado do RER para o aparelho de Golgi, onde é empacotado em agregados cilíndricos dentro de vesículas secretoras, e então exportado para o espaço extracelular por exocitose. Neste momento, as extensões não helicoidais do pró-colágeno são removidas no espaço extracelular por proteinases *N*- e *C*-terminais específicas para o pró-colágeno (Fig. 28.3, etapa 6). As moléculas de "tropocolágeno" montam-se então em fibrilas de colágeno insolúveis, que mais adiante vão ser estabilizadas pela formação de ligações cruzadas intermoleculares derivadas de aldeído. A lisil oxidase (não confundir com a lisil hidroxilase envolvida na formação da hidroxilisina) desamina oxidativamente o grupo amina das cadeias laterais de alguns resíduos de lisina e hidroxilisina, produzindo derivados reativos de aldeído, conhecidos como alisina e hidroxialisina. Estes grupos aldeídicos formam neste momento produtos de condensação aldol com outros grupos aldeídicos vizinhos, gerando ligações cruzadas tanto dentro quanto entre as moléculas de tripla hélice. Eles também podem reagir com os grupos amina de resíduos não oxidados de lisina e de hidroxilisina para formar as ligações cruzadas da base de Schiff (imina) (Fig. 28.4). Os produtos iniciais podem se reorganizar; ou podem ser desidratados, ou reduzidos para formar ligações cruzadas estáveis, como a lisinonorleucina. Estudos com β-aminopropionitrilo, que inibe a enzima lisil oxidase, têm demonstrado que a formação das ligações cruzadas do colágeno é o principal determinante para as propriedades mecânicas dos tecidos e para a sua força.

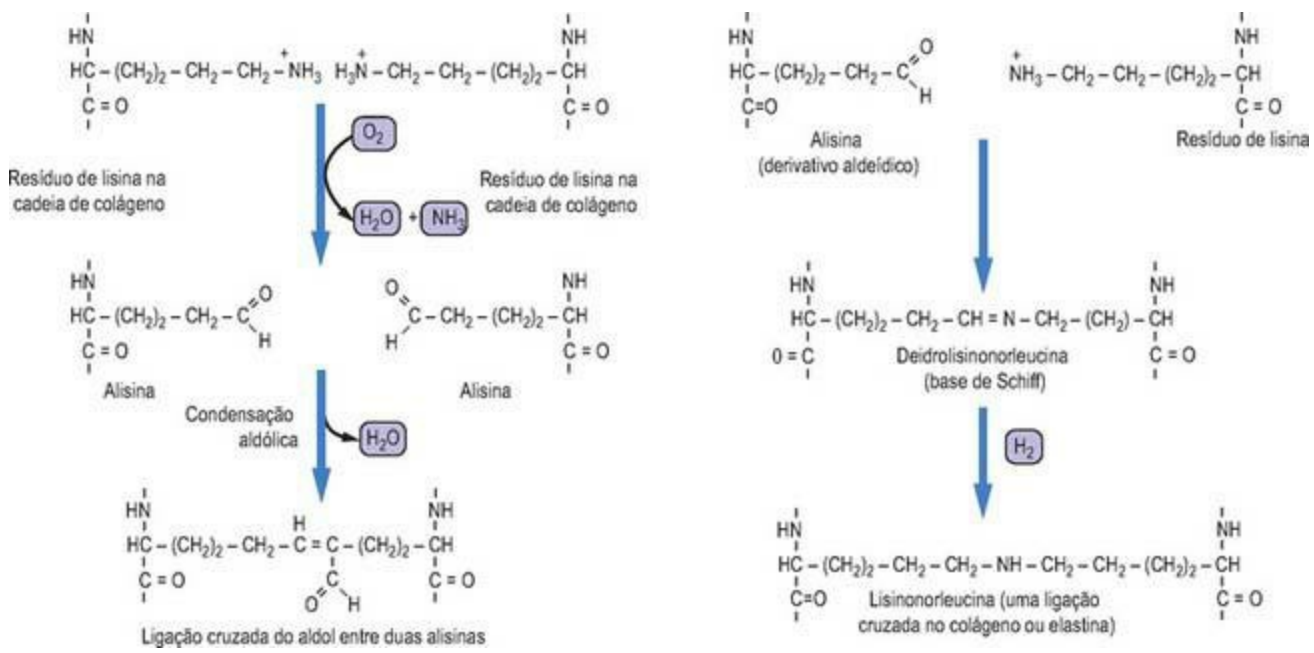


Fig. 28.4 Formação da ligação cruzada do colágeno. A alisina (e a hidroxialisina) são precursores da formação da ligação cruzada do colágeno pela (A) condensação aldólica e (B) com a base de Schiff (imina) como intermediária.

LATIRISMO: O RESULTADO DA INIBIÇÃO DA LISIL OXIDASE

O latirismo é uma doença induzida pela dieta caracterizada pela deformação da coluna, deslocamento das articulações, desmineralização dos ossos, aneurismas aórticos e hemorragias articulares. Estes problemas se desenvolvem como um resultado da inibição da lisil oxidase, uma enzima necessária para as ligações cruzadas das cadeias de colágeno. O latirismo pode ser causado pela ingestão crônica de ervilha-de-cheiro, *Lathyrus odoratus*, cujas sementes contêm β-aminopropionitrilo, um inibidor irreversível da lisil oxidase. A penicilamina, um composto tiol usado para a terapia de quelação em casos de toxicidade por metais pesados, também causa latirismo por causa da quelação adicional do cobre que é necessário para a atividade da lisil oxidase, ou da reação com os grupos aldeídos da (hidroxi)alisina, inibindo as reações de ligação cruzada do colágeno.

PROTEÍNAS NÃO COLAGENOSAS NA MATRIZ EXTRACELULAR

Elastina

A flexibilidade requerida para a função dos vasos sanguíneos, pulmões, ligamentos e pele é fornecida por uma rede de fibras elásticas na MEC desses tecidos. A proteína predominante das fibras elásticas é a elastina. Diferentemente da família multigênica do colágeno, existe apenas um gene para a elastina, que codifica um polipeptídio com cerca de 750 aminoácidos de comprimento. Em comum com os colágenos, ela é rica em resíduos de glicina e de prolina, porém mais hidrofóbica: um em cada sete dos seus aminoácidos é uma valina. Diferentemente dos colágenos, a elastina contém pouca hidroxiprolina e nenhuma hidroxilisina ou cadeias de carboidrato, além de não apresentar uma estrutura secundária regular. Sua estrutura primária consiste em domínios hidrofílicos e hidrofóbicos alternados, ricos em lisina evalina. As lisinas estão envolvidas nas ligações cruzadas intermoleculares, enquanto as fracas interações entre os resíduos de valina nos domínios hidrofóbicos conferem a elasticidade à molécula.

A elastina pode esticar em duas dimensões

A forma monomérica solúvel da elastina inicialmente sintetizada no RER é chamada de tropoelastina. Com exceção de alguma hidroxilação da prolina, a tropoelastina não sofre modificação pós-traducional. Durante o processo de montagem no espaço extracelular, a lisil oxidase gera alisina em sequências específicas: -Lis-Ala-Ala-Lis- e -Lis-Ala-Ala-Ala-Lis-. Como o colágeno, o aldeído reativo da alisina se condensa com outras alisinas ou com lisinas não modificadas. A alisina e a de-hidrolisinonorleucina em diferentes cadeias de tropoelastina também se condensam para formar ligações cruzadas de piridínio – estruturas heterocíclicas conhecidas como desmosinas e isodesmosinas (Fig. 28.5). Por causa da forma que os monômeros de elastina são interligados em polímeros, a elastina pode se esticar em duas dimensões.

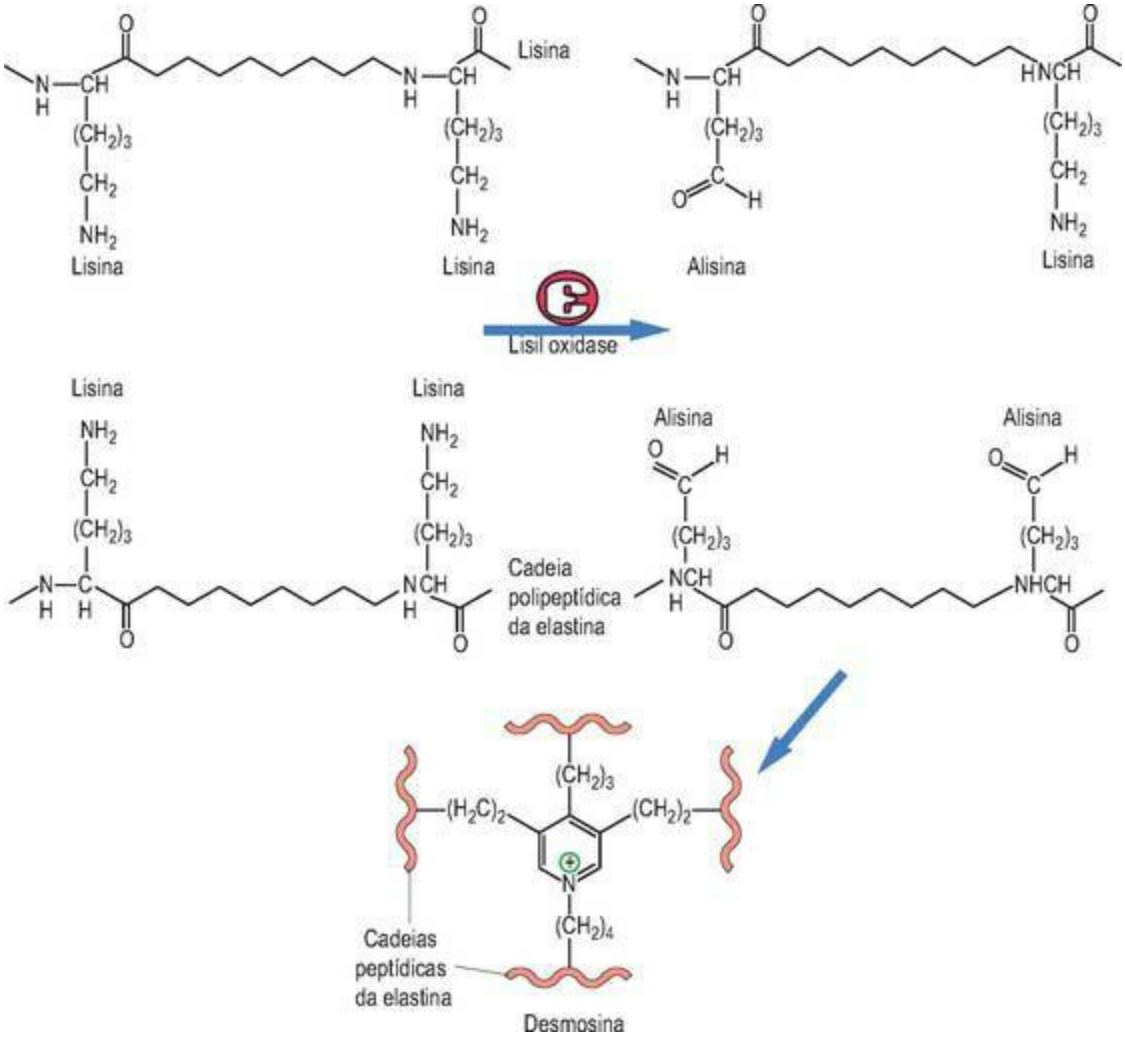


Fig. 28.5 Desmosina – uma ligação cruzada multicadeia na elastina. Resíduos de alisina e deidrolisinonorleucina em cadeias de elastina adjacentes reagem para formar o polímero elástico tridimensional com ligações cruzadas feitas pela desmosina.

SÍNDROME DE MARFAN: RESULTADO DE MUTAÇÕES NO GENE PARA FIBRILINA

A ultraestrutura das fibras elásticas revela a elastina como um eixo amorfo, polimérico e insolúvel coberto por uma bainha de microfibrilas que contribuem para a estabilidade da fibra elástica. A glicoproteína fibrilina é o constituinte predominante das microfibrilas. A síndrome de Marfan é uma doença genética relativamente rara dos tecidos conjuntivos, causada por mutações no gene para fibrilina (frequência: 1 em 10.000 nascimentos). Pessoas com esta doença apresentam estatura tipicamente alta, pernas e braços longos e aracnodactilia (dedos longos com forma semelhante às patas de aranha). Esta doença (em sua forma mais branda) causa articulações frouxas, coluna vertebral deformada, prolapso da valva mitral (levando à regurgitação cardíaca) e problemas oculares, como o deslocamento do cristalino. Em indivíduos gravemente afetados, a parede da aorta é propícia a rupturas por causa dos defeitos na formação das fibras elásticas.

Fibronectina

A fibronectina é uma glicoproteína que se apresenta como um componente estrutural da MEC e também está presente no plasma como uma proteína solúvel. A fibronectina é um dímero de duas subunidades idênticas, cada uma com cerca de 230 kDa, ligadas por pontes de dissulfeto em seus terminais carboxila. Cada subunidade é organizada em domínios, conhecidos como domínios do tipo I, II e III, e cada um desses domínios possui várias unidades homólogas repetidas, ou módulos, em sua estrutura primária (Fig. 28.6): existem 12 módulos do tipo I, dois módulos do tipo II, e de 15-17 módulos do tipo III. Cada módulo é dobrado independentemente, formando uma estrutura semelhante a um "colar de contas". Pelo menos 20 isoformas diferentes de fibronectina específicas de tecido foram identificadas, todas produzidas por *splicing* alternativo de um único ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) precursor. O *splicing* alternativo é regulado não só de forma tecidual específica, mas também durante a embriogênese, a cicatrização e a oncogênese. A fibronectina plasmática secretada, principalmente por células hepáticas, é desprovida de dois módulos do tipo III, que são encontrados nas formas de fibronectina associadas à célula e à matriz. Por causa da sua estrutura com multidomínios e da sua habilidade de interagir com as células e com outros componentes da MEC, alterações na expressão da fibronectina afetam a adesão e a migração celular, a morfogênese embrionária, a organização do citoesqueleto e da MEC.

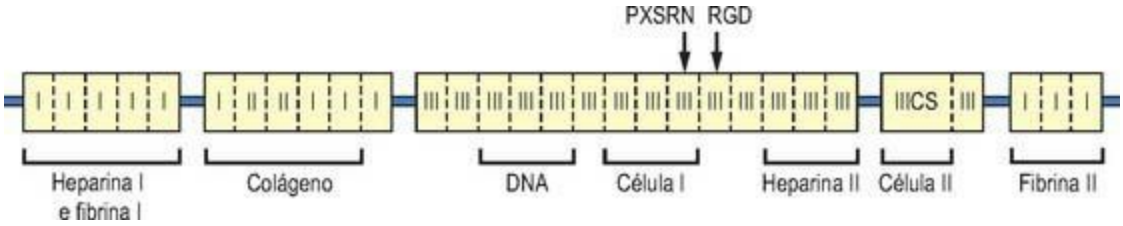


Fig. 28.6 Mapa estrutural da fibronectina. A figura mostra vários domínios globulares e domínios envolvidos nas ligações com as diversas moléculas na célula e na MEC. RGD, Arg-Gly-Asp; PXSRN, Pro-X-Ser-Arg-Asn.

Os domínios funcionais na fibronectina têm sido identificados por meio de sua afinidade de ligação com outros componentes da MEC, incluindo o colágeno, a heparina, a fibrina e a superfície celular. Os módulos do tipo I interagem com a fibrina, a heparina e o colágeno; os módulos do tipo II possuem domínios ligantes de colágeno; e os módulos do tipo III estão envolvidos na ligação com a heparina e com a superfície celular. As interações específicas foram adicionalmente mapeadas para curtos trechos de aminoácidos. Uma pequena sequência peptídica contendo Arg-Gly-Asp (RGD), presente na 10ª repetição do módulo do tipo III da fibronectina, liga-se a proteínas da família das integrinas presentes nas superfícies celulares; esta sequência não é única para a fibronectina, mas é também encontrada em outras proteínas na MEC. Uma outra sequência, Pro-X-Ser-Arg-Asn (PXSRN), presente na nona repetição do módulo do tipo III, é também implicada na adesão celular mediada por integrina. As integrinas são uma família de proteínas transmembrana que se ligam às proteínas extracelulares no lado externo e às proteínas do citoesqueleto, como a actina, no interior da célula, promovendo um mecanismo de comunicação entre os meios intracelular e extracelular. A perda da fibronectina na superfície de várias células tumorais pode contribuir para a sua liberação na circulação e penetração através da MEC, uma das primeiras etapas na metástase tumoral.

Lamininas

As lamininas constituem uma família de glicoproteínas não colagenosas encontradas nas membranas basais e expressas de formas diversas em diferentes tecidos. Estas são grandes moléculas heterotriméricas (850 kDa), compostas por cadeias α, β e γ. Até o presente, cinco cadeias α, quatro cadeias β e três cadeias γ foram identificadas, as quais podem se associar para produzir pelo menos 15 variantes de laminina diferentes. As três cadeias estão arranjadas em uma molécula assimétrica em forma de cruz, mantidas juntas por ligações dissulfeto (Fig. 28.7). As lamininas sofrem polimerização espontânea reversível na presença de cálcio, contribuindo para a elaboração da complexa rede na membrana basal. Estudos bioquímicos e de microscopia eletrônica indicam que todos os braços curtos distendidos da laminina são necessários para a polimerização espontânea, e que o polímero é formado pela junção das extremidades dos braços curtos em uma rede polimérica. Semelhante à fibronectina, as lamininas interagem com as células por múltiplos sítios de ligação em diversos domínios da molécula. As cadeias α possuem locais de ligação para integrinas e sulfato de heparano (ver a seguir). Os polímeros de laminina também são conectados ao colágeno do tipo IV por uma proteína de cadeia única, nidogênio ou entactina, que possui um local de ligação para o colágeno e, em comum com a fibronectina, também apresentam uma sequência RGD para ligação da integrina. O nidogênio também se liga a proteínas centrais dos proteoglicanos (ver a seguir). Ele desempenha um papel central na formação de ligações cruzadas entre a laminina e o colágeno do tipo IV, gerando uma plataforma para a ancoragem das células e das moléculas da MEC nas membranas basais.

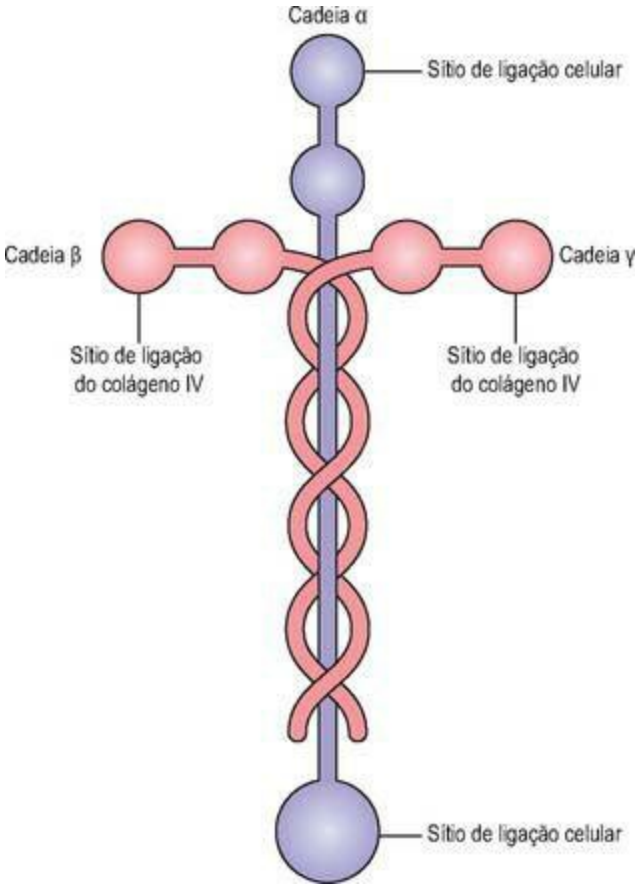


Fig. 28.7 **Estrutura da laminina.** Este esquema ilustra o aspecto cruciforme de um heterotrímero de laminina. As indicações mostram alguns sítios de ligação da molécula de laminina.

DISTROFIA MUSCULAR

Distrofias musculares formam um grupo heterogêneo de desordens genéticas que resultam em um progressivo declínio na força e na estrutura muscular. Até o exato momento, as mutações que resultam na distrofia muscular já foram identificadas em mais de 30 genes. Vários dos produtos gênicos identificados são componentes do complexo MEC-superfície celular-citoesqueleto das células musculares. Em especial, uma classe da distrofia muscular é causada por mutações na cadeia α2 da laminina-2. Estas mutações impedem a formação normal do polímero da laminina-2 e resultam na organização anormal da membrana basal circundante das fibras musculares esqueléticas dos pacientes com este tipo de distrofia muscular.

EPIDERMÓLISE BOLHOSA

Epidermólise bolhosa é uma rara desordem hereditária caracterizada pela grave formação de bolhas na pele e no tecido epitelial. Três tipos são conhecidos:

- **Simples:** Formação de bolhas na epiderme, causada por defeitos nos filamentos de queratina
- **Juncional:** Formação de bolhas na junção dermoepidérmica, causada por defeitos na laminina
- **Distrófica:** Formação de bolhas na derme, causada por mutações no gene que codifica o colágeno do tipo VII.

A epidermólise bolhosa ilustra a natureza multifatorial das doenças do tecido conjuntivo que possuem características clínicas similares.

PROTEOGLICANOS

Os proteoglicanos são componentes da MEC formadores de gel e constituem o que classicamente tem sido chamado de “substância fundamental”. Alguns proteoglicanos localizam-se na superfície celular, onde se ligam a fatores de crescimento e outros componentes da MEC. Eles são compostos de cadeias peptídicas contendo açúcares ligados covalentemente. Entretanto, as cadeias peptídicas dos proteoglicanos geralmente são mais rígidas e mais longas que as porções proteicas das glicoproteínas; os proteoglicanos contêm quantidades muito maiores de carboidrato – tipicamente carboidrato > 95%. As cadeias de açúcar são oligossacarídeos lineares, não ramificados, que são muito mais longos do que aqueles das glicoproteínas, e podem conter mais de 100 resíduos de açúcar em uma única cadeia. Além disso, as cadeias de oligossacarídeos dos proteoglicanos possuem uma unidade dissacarídeo repetida, geralmente composta por um ácido urônico e um açúcar aminado. As cadeias de oligossacarídeos dos proteoglicanos são polianiônicas por causa das muitas cargas negativas dos grupos carboxila dos ácidos urônicos, bem como dos grupos sulfatos ligados a alguns dos grupos hidroxila ou amina dos açúcares.

Estruturas dos proteoglicanos

As estruturas gerais dos glicosaminoglicanos (GAGs), a parte de carboidrato dos proteoglicanos, são mostradas na Tabela 28.2. A repetição dissacarídica é diferente para cada tipo de GAG, mas é geralmente composta por uma hexosamina e um resíduo de ácido urônico, exceto no caso do sulfato de queratano, no qual o ácido urônico é substituído por galactose. O açúcar aminado nas GAGs costuma ser a glicosamina ($GlcNH_2$) ou a galactosamina ($GalNH_2$); ambas estão presentes principalmente em suas formas *N*-acetiladas (GlcNAc e GalNAc), embora em algumas das GAGs (heparina e sulfato de heparano) o grupo amina é sulfatado, em vez de acetilado. O ácido urônico é geralmente o ácido D-glicurônico (GlcUA), mas em alguns casos (sulfato de dermatano, heparina) ele pode ser o ácido L-idurônico (IdUA). Com exceção do ácido hialurônico e do sulfato de queratano, todas as GAGs são ancoradas às proteínas por uma ponte trissacarídica, Gal-Gal-Xyl, sendo a xilose ligada ao resíduo de serina ou de treonina de uma proteína central. O sulfato de queratano também é ligado à proteína, mas neste caso a ligação é feita por um oligossacarídeo *N*-ligado (sulfato de queratano I), ou de um oligossacarídeo *O*-ligado (sulfato de queratano II). O ácido hialurônico, que possui as maiores cadeias polissacarídeas, é a única GAG que não parece estar ligada a uma proteína central.

Tabela 28.2 Estrutura e distribuição dos proteoglicanos.

Proteoglicano	Dissacarídeo característico	Sulfatação	Localização tecidual
Ácido hialurônico	[4GlcUAβ1-3GlcNAcβ1]	nenhuma	fluidos articulares e oculares
Sulfatos de condroitina	[4GlcUAβ1-3GalNAcβ1]	GalNAc	cartilagem, tendões e osso
Sulfato de dermatano	[4IdUAα1-3GalNAcβ1]	IdUA, GalNAc	pele, válvulas, vasos sanguíneos
Sulfato de heparano	[4IdUAα1-4GlcNAcβ1]	GlcNAc	superfícies celulares
Heparina	[4IdUAα1-4GlcNAcβ1]	$GlcNH_2$, IdUA	mastócitos, fígado
Sulfatos de queratano	[3Galβ1-4GlcNAcβ1]	GlcNAc	cartilagem, córnea

GalNAc, N-acetilgalactosamina; $GlcNH_2$, glicosamina; GlcUA, ácido D-glicurônico; IdUA, ácido L-idurônico..

Ácido hialurônico

O ácido hialurônico é composto por unidades repetidas de GlcUA e de GlcNAc. Esta cadeia polissacarídica é a mais longa das GAGs, com peso molecular de 10^5-10^7 Da (250-25.000 unidades dissacarídicas repetidas), sendo a única GAG não sulfatada.

Sulfatos de condroitina

Os sulfatos de condroitina são os principais componentes da cartilagem. Eles contêm particularmente

GalNAc em vez de GlcNAc como açúcar aminado, e as suas cadeias polissacarídeas são menores: 2-5 × 10^5 Da. As cadeias de condroitina são ligadas à proteína pela região do trissacarídio de ligação (Gal-Gal-Xyl) e contêm resíduos de sulfato ligados no grupo 4- ou 6-hidroxila da GalNAc.

Sulfato de dermatano

O sulfato de dermatano foi originalmente isolado da pele, mas também é encontrado nos vasos sanguíneos, nos tendões e nas válvulas cardíacas. Esta GAG tem estrutura similar ao sulfato de condroitina, porém possui uma variável quantidade de ácido$_L$-idurônico (IdUA), o epímero *C*-5 da$_D$-GlcUA, formado em uma reação não usual, pela epimerização do GlcUA, após ter sido incorporado no polímero. O sulfato de dermatano possui uma densidade de carga mais alta do que os sulfatos de condroitina, pois contém resíduos sulfato na posição *C*-2 em alguns resíduos de IdUA, e nos grupos 4-hidroxila da GalNAc.

Heparina e sulfato de heparano

A heparina e o sulfato de heparano consistem sobretudo em repetidas unidades dissacarídicas de $GlcNH_2$ com IdUA ou GlcUA, respectivamente. A ligação entre o açúcar aminado e o ácido urônico é uniformemente 1-4, em vez das ligações alternadas 1-4/1-3 observadas em outras GAGs. A maioria das unidades $GlcNH_2$ da heparina é *N*-sulfatada, enquanto muitos dos resíduos de IdUA são sulfatados no grupo hidroxila do *C-2*, e os resíduos de $GlcNH_2$ são no grupo hidroxila do *C-6*. A heparina e o sulfato de heparano são as GAGs mais altamente carregadas. Ainda que as estruturas desses dois polímeros sejam intimamente relacionadas, suas distribuições no corpo e suas funções são totalmente diferentes: a heparina é uma pequena molécula micro-heterogênea (quase 3.000-30.000 Da), encontrada intracelularmente como um proteoglicano. Ela é liberada para o espaço extracelular como um polissacarídeo livre (GAG) e possui forte atividade anticoagulante (Cap. 7). Em contrapartida, o sulfato de heparano é ligado à MEC ou à superfície das células, e possui apenas fraca atividade anticoagulante.

Sulfato de queratano

A estrutura final das GAGs, mostrada na Tabela 28.2, é o sulfato de queratano (QS). Esta é uma GAG particularmente incomum porque ela é ligada à proteína por meio de um oligossacarídeo *N*-ligado (QS I) ou de um oligossacarídeo *O*-ligado (QS II). Assim esta GAG possui características comuns a ambos proteoglicanos e glicoproteínas. Contudo, o sulfato de queratano é considerado um proteoglicano por causa da porção glicana que possui uma unidade dissacarídica repetida e uma longa cadeia linear. A unidade repetida é composta por GlcNAc e galactose em lugar do ácido urônico. Ambas, a GlcNAc e a galactose, são geralmente sulfatadas nos grupos hidroxila *C-6*.

Síntese e degradação dos proteoglicanos

Os proteoglicanos são sintetizados por uma série de glicosil transferases, epimerases e sulfotransferases, iniciando com a síntese do centro do oligossacarídeo enquanto a proteína central ainda está no RER. A síntese do oligossacarídeo repetido e outras modificações ocorrem no aparelho de Golgi. Tal como acontece na síntese das glicoproteínas e glicolipídios, enzimas distintas estão envolvidas em etapas individuais. Por exemplo, existem galactosil transferases separadas para cada unidade de galactose da ponte de ligação, uma GlcUA transferase distinta para a ponte de ligação e dissacarídeos em repetidos e diferentes sulfotransferases (Cap. 27) para as posições *C*-4 e *C*-6 dos resíduos GalNAc dos sulfatos de condroitina. O fosfossulfato de fosfoadenosina (PAPS) é o doador de sulfato para as sulfotransferases. Estas vias estão ilustradas na Figura 28.8, para o 6-sulfato de condroitina.

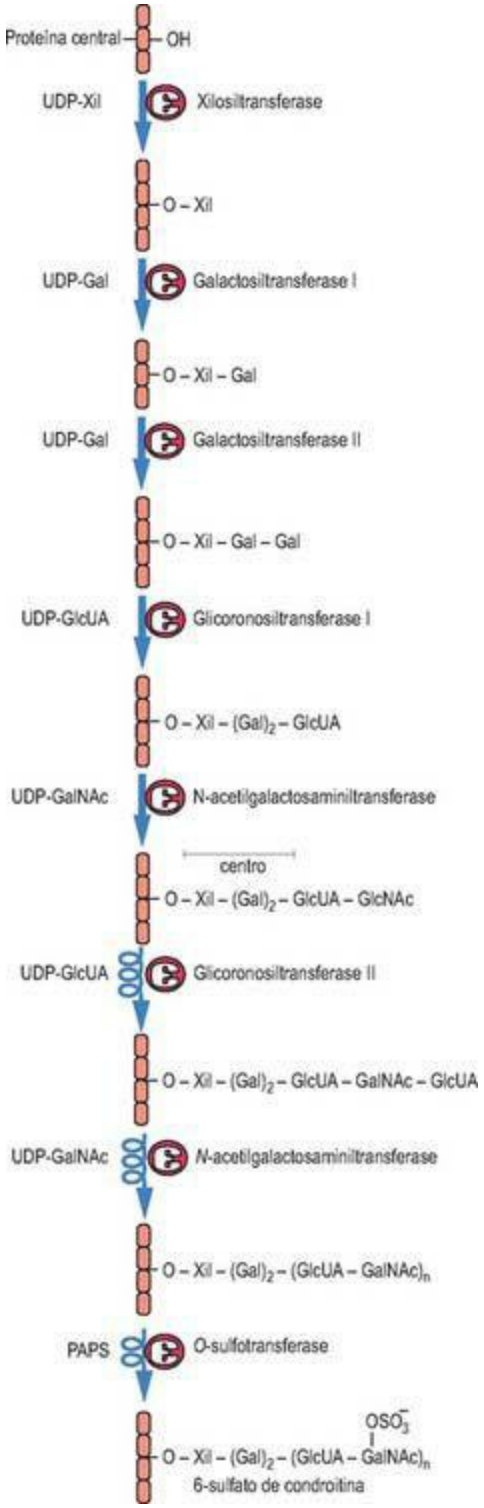


Fig. 28.8 Síntese do proteoglicano 6-sulfato de condroitina. Diversas enzimas participam desta via. Xil, xilose.

Defeitos na degradação de proteoglicanos levam a mucopolissacaridoses

A degradação dos proteoglicanos ocorre nos lisossomos. A porção proteica é degradada por proteases lisossomais e as cadeias de GAG são degradadas por ações sequenciais de várias hidrolases ácidas lisossomais diferentes. A degradação gradativa das GAGs envolve exoglicosidases e sulfatases, iniciando da extremidade livre da cadeia de glicana. Esta reação pode envolver a remoção de sulfato por uma sulfatase, posteriormente a remoção do açúcar terminal por uma glicosidase específica, e assim por diante. A Figura 28.9 mostra as etapas da degradação do sulfato de dermatano. Assim como na degradação dos glicoesfingolipídios, se uma das enzimas envolvidas nas etapas gradativas da via estiver faltando, todo processo de degradação é interrompido neste

ponto e as moléculas não degradadas se acumulam nos lisossomos. As doenças de depósito lisossomal resultantes da acumulação das GAGs são conhecidas como mucopolissacaridoses (Tabela 28.3) por causa da designação original das GAGs como mucopolissacarídeos. Existem mais de uma dúzia de mucopolissacaridoses resultantes de defeito na degradação das GAGs. Em geral, estas doenças podem ser diagnosticadas pela identificação de cadeias específicas de GAGs na urina, seguida pela análise de hidrolases específicas em leucócitos ou fibroblastos.

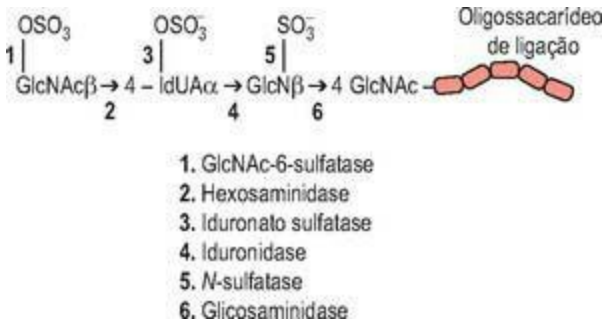


Fig. 28.9 Degradação do sulfato de dermatano. Esta reação ocorre por meio de uma sequência definida de atividades de hidrolases lisossômicas.

Tabela 28.3 Defeitos enzimáticos característicos de várias mucopolissacaridoses.

As mucopolissacaridoses		
Síndrome	**Enzima deficiente**	**Produto acumulado nos lisossomos e secretado na urina**
De Hunter	iduronato sulfatase	Sulfatos de heparano e dermatano
De Hurler	α-iduronidase	sulfatos de heparano e dermatano
De MorquioA	galactose-6-sulfatase	sulfato de queratano
De Morquio B	β-galactosidade	sulfato de queratano
De SanfilippoA	heparano sulfamidase	sulfato de heparano
De Sanfilippo B	W-acetilglicosaminidase	
De Sanfilippo C	W-acetilglicosamina-6-sulfatase	

MECANISMOS DO EFEITO ANTICOAGULANTE DA HEPARINA

A heparina é um oligossacarídeo polianiônico, heterogêneo (3.000-30.000 kDa), ativador da antitrombina III (AT-III) (Cap. 7). A AT-III é um inibidor lento, porém quantitativamente importante da trombina (fator X) e de outros fatores (IX, XI, XII) na cascata de formação do coágulo. Quando a heparina de liga à AT-III, ela converte a AT-III de um inibidor lento em um inibidor rápido das enzimas coagulantes. A heparina interage com um resíduo de lisina na AT-III e induz a uma mudança conformacional que promove a ligação covalente da AT-III aos centros ativos de serina das enzimas da coagulação, inibindo assim a sua atividade pró-coagulante. Então, a heparina se dissocia do complexo ternário e pode ser reciclada para a anticoagulação. O menor e mais ativo componente da heparina é um pentassacarídeo que possui K_d de quase 10 μmol/L: GlcN-(*N*-sulfato-6-*O*-sulfato)-α1,4-GlcUA-β1,4-GlcN-(*N*-sulfato-3,6-di-*O*-sulfato)-α1,4-IdUA-(2-*O*-sulfato)-α-1,4-GlcN-(*N*-sulfato-6-*O*-sulfato). A heparina possui uma meia-vida de 30 minutos na circulação, desta forma é normalmente administrada por infusão. A heparina não possui atividade fibrinolítica, portanto ela não hidrolisará coágulos já existentes. Além da sua atividade anticoagulante, a heparina também libera várias enzimas dos sítios de ligação de proteoglicanos na parede vascular, incluindo lipoproteína lipase, que é frequentemente analisada como atividade plasmática da lipoproteína lípase liberada pela heparina ou lípase pós-heparina. A lipoproteína lipase é induzida pela insulina, e a atividade diminuída dessa enzima retarda a remoção (*clearance*) dos quilomícrons e VLDL do plasma,

contribuindo para a hipertrigliceridemia na diabetes (Cap. 18).

Funções dos proteoglicanos

Escovas de garrafa, gel moldável e concreto reforçado

Os proteoglicanos são encontrados em associação com a maioria dos tecidos e células. Um dos seus principais papéis é fornecer suporte estrutural para os tecidos, especialmente para a cartilagem e o tecido conjuntivo. Na cartilagem, grandes agregados compostos por cadeias de sulfato de condroitina e de sulfato de queratano ligadas às suas proteínas centrais são associados não covalentemente ao ácido hialurônico por meio de proteínas de ligação, formando uma matriz semelhante à gelatina, na qual fibras colágenas estão embebidas. Este agregado de macromoléculas, em estrutura similar de "escova de garrafa" conhecida como agrecano (Fig. 28.10), fornece tanto rigidez como estabilidade para o tecido conjuntivo. Em virtude de sua carga negativa, as GAGs ligam grandes quantidades de cátions monovalentes e divalentes: uma molécula de proteoglicano da cartilagem de 2×10^6 Da pode ter um agregado de cargas negativas de cerca de 10.000. Consequentemente, a manutenção da neutralidade elétrica requer uma alta concentração de íons de carga oposta. Esses íons atraem a água para dentro da MEC, causando sua turgidez e enrijecimento, o resultado da tensão entre forças osmóticas e interações de ligação entre os proteoglicanos e o colágeno. A estrutura e a hidratação da MEC permitem algum grau de rigidez combinada com flexibilidade e compressibilidade, capacitando o tecido a suportar torções e choques. Os agregados de ácido hialurônico-proteoglicano-colágeno nos discos vertebrais e articulares possuem algumas das propriedades viscoelásticas de "gel moldável", compressibilidade mais elasticidade, amortecendo assim o impacto entre os ossos. Estes discos são comprimidos durante o dia, expandem-se elasticamente durante a noite, e deformam-se gradualmente com a idade.

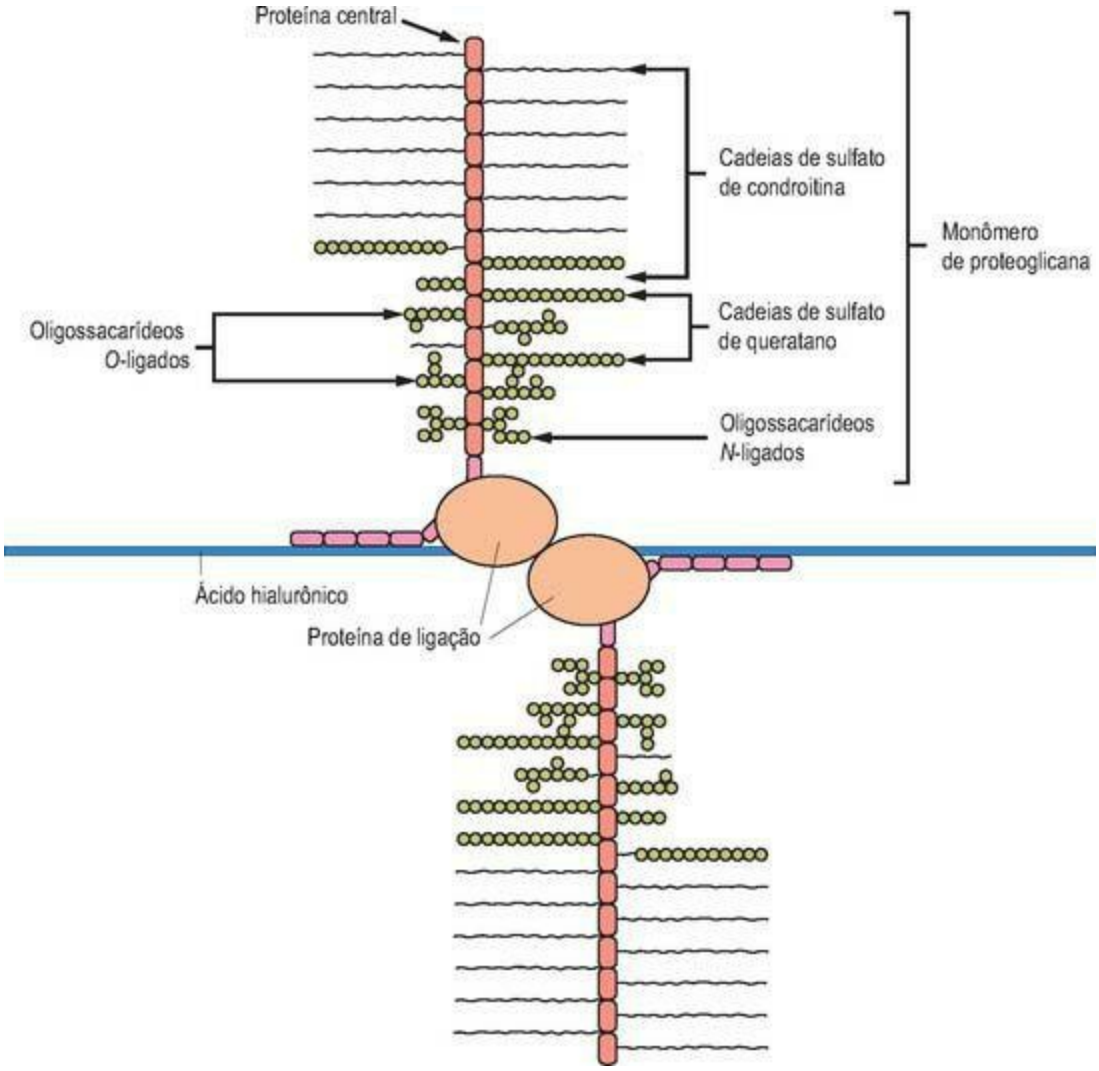


Fig. 28.10 Estrutura do agrecano. As associações entre proteoglicanos e o ácido hialurônico formam uma estrutura de agrecano na matriz extracelular (MEC). A extensão dessa estrutura gera um arranjo tridimensional dos proteoglicanos ligados ao ácido hialurônico, que cria uma matriz rígida ou uma estrutura similar a uma "escova de garrafa", na qual o colágeno e outros componentes da MEC estão embebidos.

A estrutura geral da cartilagem pode ser comparada com as colunas verticais fortificadas de concreto reforçado utilizadas na construção de grandes edifícios, nas quais os vergalhões de aço (fibras colágenas) estão embebidos em uma camada amorfa de cimento (os agregados de proteoglicanos). O colágeno estabiliza a rede de proteoglicanos na cartilagem da mesma forma que os reforçados vergalhões de aço no concreto promovem a resistência estrutural para as paredes de cimento. A estrutura das construções resistentes a terremotos, assim como da MEC, fornece equilíbrio entre a integridade e a flexibilidade.

Embora as quantidades envolvidas sejam baixas, comparadas com aquelas na pele e na cartilagem, órgãos como o fígado, cérebro e os rins também contêm uma variedade de proteoglicanos:

- **fígado:** o sulfato de heparano é a principal GAG; está presente tanto intracelularmente quanto na superfície celular do hepatócito, e a adesão dos hepatócitos ao seu substrato em cultura de células é mediada, em parte, por estes proteoglicanos.

- **rim:** mudanças tanto no conteúdo de colágeno quanto no de proteoglicanos na membrana basal renal estão associadas à doença renal diabética. Neste caso, a mudança na estrutura e a carga do agregado

de proteoglicanos, conhecido como perlecano, está associada a uma mudança na filtração seletiva do glomérulo (Cap. 23).

- **córnea:** duas populações de proteoglicanos foram identificados na córnea: uma população que contém sulfato de queratano e outra população, sulfato de dermatano. Estas moléculas apresentam um tamanho hidrodinâmico muito menor que os grandes proteoglicanos da cartilagem, o que pode ser necessário para a interação dos proteoglicanos da córnea com as fibras colágenas, firmemente agrupadas e orientadas neste tecido transparente. A turvação da córnea na distrofia córnea macular está associada à sulfatação ineficiente da proteoglicana sulfato de queratano I.

Outros agregados de glicanas complexos, com sutis variações na estrutura da proteína central e na composição de glicanas, estão distribuídos em compartimentos intracelulares, membranas plasmáticas e no espaço extracelular de modo tecido-específico, variando com a idade e com as doenças.

MATRIZ EXTRACELULAR E ENGENHARIA TECIDUAL

Desde a década passada, vem aumentando consideravelmente o interesse em produzir tecidos substitutos por meio da engenharia tecidual. O objetivo fundamental da engenharia tecidual é combinar células e biomateriais apropriados para produzir tecidos equivalentes, que favoravelmente simulam tecidos e órgãos normais e possam substituir tecidos danificados ou doentes. Como as propriedades biológicas e mecânicas de um tecido são determinadas, em parte, pela composição heterogênea e pela organização da MEC, o sucesso na criação de equivalentes teciduais demandará o desenvolvimento de moldes tridimensionais da MEC apropriados. Avanços neste campo relativamente novo requerem um completo entendimento da MEC normal e patológica.

Alguns proteoglicanos ou GAGs, especialmente heparina e o sulfato de heparano, possuem papéis fisiológicos importantes em ligar proteínas ou outras macromoléculas:

- **mastócitos** (células granuladas envolvidas na resposta inflamatória): acredita-se que a heparina funcione como um sítio de ligação intracelular para proteinases nos grânulos secretores.

- **parede vascular:** os proteoglicanos estão envolvidos com a ligação de proteínas e enzimas, tais como a lipoproteína de baixa densidade e a lipoproteína lipase, na parede vascular. Eles também podem inibir a formação de coágulos na parede vascular pela ativação da antitrombina III na superfície endotelial(Cap. 7).

Resumo

A MEC contém um arranjo complexo de colágenos formadores de rede e fibrilares, fibras elásticas, bem como uma matriz rígida e gelatinosa de proteoglicanos e um número de glicoproteínas que medeiam a interação destas moléculas umas com as outras e com a superfície celular. Estas moléculas e suas interações proporcionam estrutura, estabilidade e elasticidade para a MEC, fornecendo uma rota para a comunicação entre os meios intra e extracelulares nos tecidos. A heterogeneidade dos componentes proteicos e dos carboidratos dessas moléculas promove a grande diversidade na estrutura e na função da MEC em vários tecidos.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Compare a estrutura da heparina, seu mecanismo de ação, sua rota e frequência de administração com outros anticoagulantes comuns, como a aspirina e derivados de cumarina.

2. Discuta os fatores que promovem a renovação dos componentes da MEC como parte do crescimento normal e desenvolvimento, e nas doenças como a artrite reumatoide.

3. Revise as consequências dos defeitos genéticos na sulfatação dos proteoglicanos.

Leituras sugeridas

Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. 2003;200:423-428.

Holmbeck K, Szabova L. Aspects of extracellular matrix remodeling in development and disease. *Birth Defects Res*. 2006;78:11-23.

Hulmes DJ. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J Struct Biol*. 2002;137:2-10.

Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. Collagens at a glance. *J Cell Science*. 2007;120:1955-1958.

Laurent GJ, Chambers RC, Hill MR, McAnulty RJ. Regulation of matrix turnover: fibroblasts, forces, factors and fibrosis. *Biochem Soc Trans*. 2007;35:647-651.

Paez MC, Gonzalez MJ, Serrano NC, Shoenfeld Y, Anaya JM. Physiological and pathological implications of laminins: from genes to the protein. *Autoimmunity*. 2007;40:83-94.

Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;1:S79-84.

Stupack DG. The biology of integrins. *Oncology*. 2007;21:6-12.

Sites

Arranjo de colágenos Arranjo de colágenos. www.mc.vanderbilt.edu/cmb/collagen/index.php.

Síndrome de Ehlers-Danlos:

- www.nlm.nih.gov/medlineplus/ehlersdanlossyndrome.html
- www.ednf.org

Heparina Heparina. www.kumc.edu/wichita/meded/cvresource/antithrombotic/heparin/.

Síndrome de Marfan:

- www.marfan.org
- www.nlm.nih.gov/medlineplus/marfansyndrome.html

Mucopolissacaridoses Mucopolissacaridoses. www.ninds.nih.gov/health_and_medical/pubs/mps.htm.

Papel do Fígado no Metabolismo

A.F. Jones

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Discutir a participação do fígado no metabolismo de carboidrato e, em particular, seu papel na produção endógena de glicose.
- Discutir o papel do fígado no metabolismo de lipídios.
- Delinear as alterações na síntese de proteínas hepáticas que se realiza durante a reação de fase aguda.
- Descrever os mecanismos de proteólise mediados pela ubiquitina.
- Descrever a via de síntese do heme.
- Descrever o metabolismo de bilirrubina e os principais tipos de icterícia.
- Comentar sobre o mecanismo de hepatotoxicidade de drogas e álcool.

INTRODUÇÃO

O fígado tem um papel central no metabolismo por causa da sua localização anatômica e muitas de suas funções bioquímicas. Ele recebe sangue venoso do intestino e, desta maneira, todos os produtos da digestão, além das drogas ingeridas e outros xenobióticos, enchem o fígado antes de entrar na circulação sistêmica. As células hepáticas parenquimais, os hepatócitos, têm uma imensa gama de funções sintéticas e catabólicas, que estão resumidas na Tabela 29.1. O fígado exerce papéis importantes na regulação do metabolismo de carboidrato e lipídio, no metabolismo de aminoácido, na síntese e quebra de proteínas plasmáticas, e no armazenamento de vitaminas e metais. Ele também tem a capacidade de metabolizar, e então desintoxicar, uma infinidade de xenobióticos. O fígado também tem uma função excretória, na qual produtos dos resíduos metabólicos são excretados num sistema de ramificação de ductos conhecido como árvore biliar, que, por sua vez, drena para o intestino delgado; os constituintes biliares são então excretados nas fezes.

Tabela 29.1 Função hepática. Funções das células parenquimais e suas alterações na doença hepática

Função hepática	
Função	**Marcadores plasmáticos de dano**
Catabolismo do heme	↑ bilirrubina
Metabolismo de carboidrato	↓ glicose

Síntese proteica	↓ albumina
	↑ tempo de protrombina
Catabolismo proteico	↑ amônia
	↓ ureia
Metabolismo lipídico	↑ colesterol
	↑ triglicérides
Metabolismo de drogas	↑ t1/2 da droga
Metabolismo de ácido biliar	↑ ácidos biliares

t1/2 = *meia-vida biológica.*

O fígado tem uma capacidade substancial de reserva metabólica; a doença hepática moderada pode não causar sintomas e ser somente detectada com alterações bioquímicas no sangue. No entanto, o paciente com doença hepática grave tem uma pigmentação amarela da pele (icterícia), hematomas aparecem facilmente, pode sangrar abundantemente, tem um abdome distendido com fluido (ascite), e pode estar confuso ou inconsciente (encefalopatia hepática) (Fig. 29.1). Este capítulo descreverá as funções metabólicas especializadas do fígado e as anormalidades que ocorrem na doença hepática.

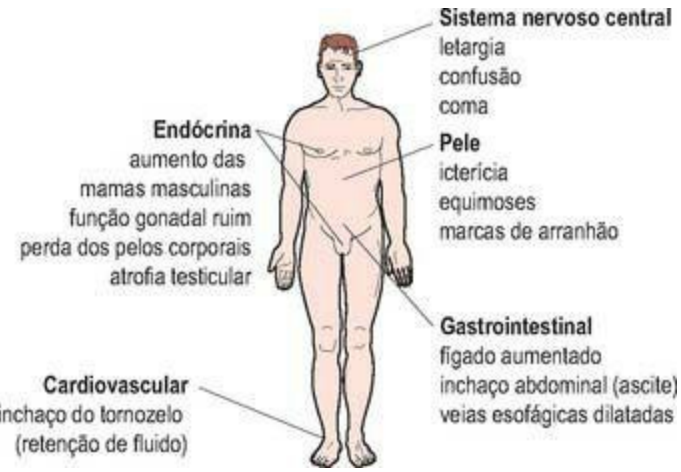


Fig. 29.1 Características clínicas da doença hepática grave.

XENOBIÓTICOS

Um xenobiótico, de acordo com o *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, é "uma substância que não ocorre naturalmente, mas interfere no metabolismo de muitos organismos".

ESTRUTURA DO FÍGADO

O fígado é o maior órgão sólido no corpo e, nos adultos, pesa cerca de 1.500 g. Aproximadamente, 75% de seu fluxo sanguíneo é suprido pela veia porta, que se origina do intestino. O sangue que sai do fígado entra no sistema venoso através da veia hepática. O componente biliar do fígado compreende a vesícula biliar e os ductos biliares.

A estrutura do fígado facilita a troca de metabólitos entre os hepatócitos e o plasma

No microscópio, a substância do fígado é composta de um grande número de lóbulos de formato poliédrico (Fig. 29.2). Os sinusoides sanguíneos originam-se das ramificações terminais da veia porta e interconectam e se entrelaçam por meio dos cordões de hepatócitos antes de se aderir à veia centro lobular.

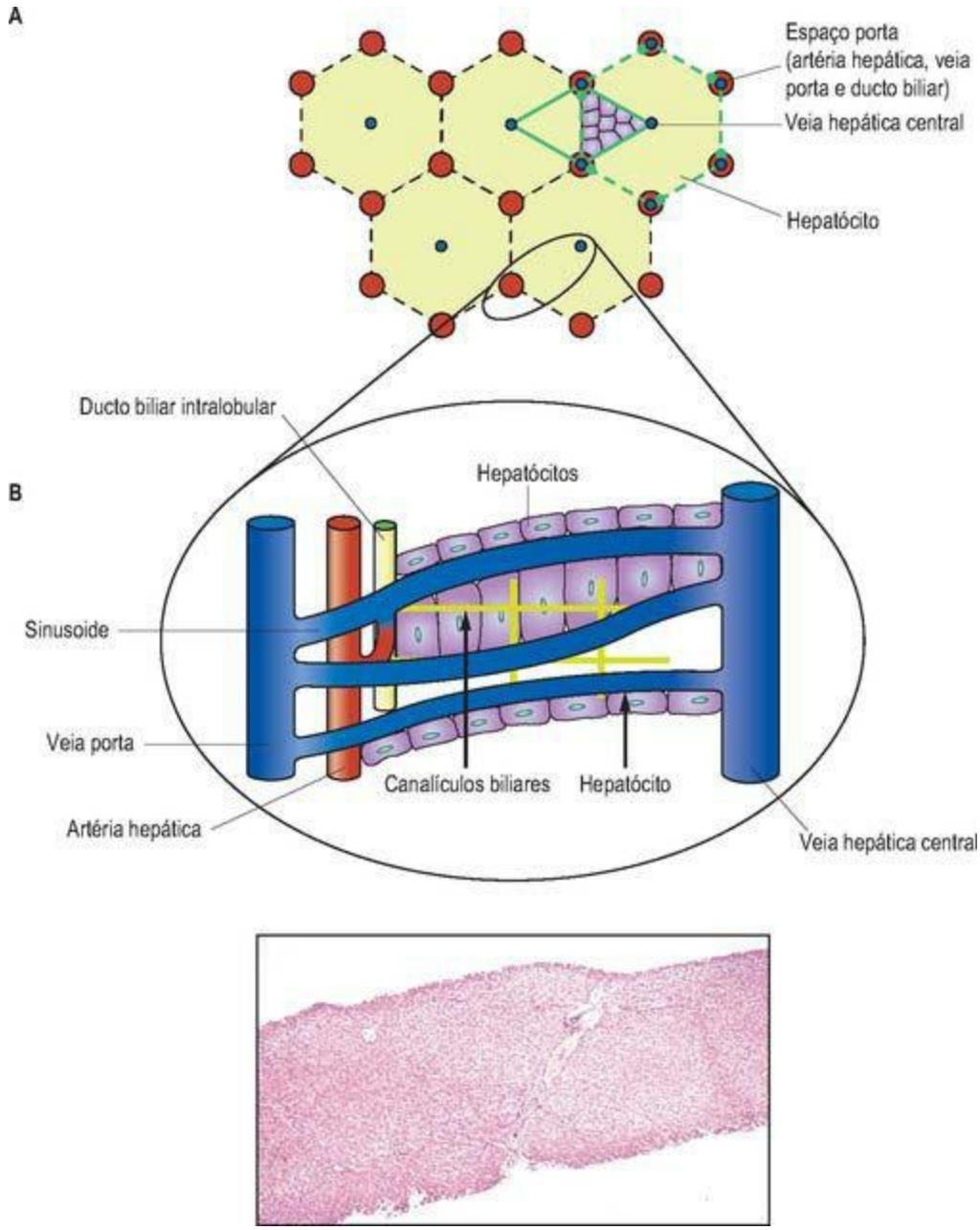


Fig. 29.2 Estrutura do fígado. (A) Esboço da estrutura. (B) Uma lâmina histológica de um fígado normal.

(Cortesia de Dr. J. Newman, Birmingham Heartlands and Solihull NHS Trust, UK.)

Os sinusoides estão delineados por dois tipos celulares. Os primeiros são as células endoteliais, que estão fracamente conectadas umas à s outras, deixando numerosas lacunas. Não existe membrana basal entre as células endoteliais e os hepatócitos. Este arranjo facilita a troca de metabólitos entre o hepatócito e o plasma. O segundo tipo de células sinusoidais, conhecidas como células de Kupffer, são fagócitos mononucleares; são geralmente encontrados nas lacunas entre as células endoteliais.

FÍGADO E METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

O fígado exerce um papel central no metabolismo da glicose, especificamente na manutenção da concentração de glicose circulante (Caps. 13 e 21). Esta função depende da sua capacidade em armazenar um suprimento de glicose na forma polimerizada como glicogênio, e em sintetizar glicose de fontes que não são carboidratos no processo de gliconeogênese.

Dependendo das condições metabólicas, o fígado pode estocar ou produzir glicose

Importante ressaltar que o fígado possui a glicose-6-fosfatase, que permite a liberação de glicose livre para o sangue (este processo é também chamado de "produção endógena de glicose"). Embora o músculo armazene mais glicogênio do que o fígado, ele não tem a glicose-6-fosfatase e, por isso, não pode contribuir diretamente para a glicose sanguínea; o rim, por sua vez, tem as atividades das enzimas gliconeogênicas e da glicose-6-fosfatase, mas elas são quantitativamente muito menores do que no fígado. Além disso, os rins não armazenam glicogênio.

O fígado de um adulto em jejum libera 9 g de glicose para o sangue a cada hora para manter a concentração de glicose periférica. Os substratos de carbono para a via de produção de glicose, a gliconeogênese, são derivados do lactato liberado pela glicólise nos tecidos periféricos (a "glicose-lactato" ou ciclo de "Cori") e da desaminação hepática dos aminoácidos gerados da proteólise do músculo esquelético (principalmente alanina, o ciclo "glicose-alanina", Cap. 21). A energia para a gliconeogênese vem da β-oxidação dos ácidos graxos. Também o produto final da β-oxidação, a acetil-CoA, estimula a atividade da piruvato carboxilase, a primeira enzima comprometida da gliconeogênese.

Na alimentação, a produção de glicose hepática da gliconeogênese é suprimida pela insulina. A glicose que entra na circulação após a alimentação entra nas células por meio de transportadores específicos de propriedades cinéticas diferentes (Tabela 8.2). O transportador de glicose 1 (GLUT-1) presente no cérebro não é sensível à insulina e tem uma constante de Michaelis (K_m) baixa, na ordem de 1 mmol/L, e uma velocidade máxima baixa, cerca de 3 mmol/L. Consequentemente, o GLUT-1 é saturado nas concentrações plasmáticas mais prevalentes de glicose e, permite ao cérebro extrair glicose a uma velocidade constante com poucas probabilidades de ser influenciada pela alimentação ou jejum. Ao contrário, a atividade do transportador GLUT-2, presente no fígado e no pâncreas, embora independentes de insulina, tem uma K_m muito alta (15-20 mmol/L). Desta maneira, estes tecidos captam glicose numa velocidade que é proporcional à concentração de glicose plasmática. No fígado, a glicose é convertida em glicogênio (Cap. 13). A captação de glicose pelo pâncreas determina a secreção de insulina pela célula-β, e o transportador GLUT-2 e/ou a hexoquinase associada atuam como sensores de glicose. Entretanto, mutações nesta hexoquinase pancreática, chamada glicoquinase, são as causas de alguns casos da chamada "diabetes da maturidade no jovem" (MODY; Cap. 21). A maioria da glicose ingerida, no entanto, fica disponível para o músculo e o tecido adiposo, que possuem outro transportador de glicose dependente de insulina, o GLUT-4, que, devido à sua K_m ser similar à média de concentração de glicose plasmática, cerca de 5 mmol/L, torna-se o "sumidouro" de glicose mais importante no estado nutrido.

FÍGADO E METABOLISMO PROTEICO

A maioria das proteínas plasmáticas é sintetizada no fígado

A doença hepatocelular pode alterar quantitativa e qualitativamente a síntese de proteína. A albumina é a proteína mais abundante no sangue e é sintetizada exclusivamente pelo fígado (Cap. 4). Baixas concentrações plasmáticas de albumina ocorrem comumente na doença hepática, mas um índice melhor da função sintética do hepatócito é a produção dos fatores de coagulação II, VII, IX e X (Cap. 7), os quais após a tradução dão suporte à γ-carboxilação em resíduos de glutamil específicos, permitindo que eles se liguem ao cálcio. Como um grupo, sua concentração funcional pode ser rapidamente avaliada no laboratório pela medida do tempo de protrombina (PT) (Cap. 7).

O fígado também sintetiza a maior parte das globulinas α e β do plasma. Suas concentrações plasmáticas mudam na doença hepática e na doença sistêmica; no último caso, essas mudanças formam uma parte da resposta de fase aguda para a doença (Cap. 4).

Proteínas de fase aguda

A resposta a um ataque agudo está associada a grandes mudanças na síntese proteica hepática

A resposta da fase aguda é um termo que engloba todas as alterações sistêmicas que ocorrem em resposta à infecção ou inflamação. O fígado sintetiza um número de "proteínas de fase aguda", que têm sido definidas como aquelas cujas concentrações plasmáticas alteram-se em mais de 25% em uma semana de dano inflamatório ou infeccioso. A produção destas proteínas é estimulada por citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos macrófagos e destas, a interleucina 1 (IL-1), IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) têm um papel central. As proteínas de fase aguda têm inúmeras funções diferentes. As proteínas de ligação, opsoninas, tal como a proteína C reativa (CRP), se ligam a macromoléculas liberadas pelo dano tecidual ou agentes infecciosos e estimula sua fagocitose (Cap. 4). Os fatores de complemento promovem a fagocitose de moléculas estranhas. As proteases inibidoras, tais como a α1-antitripsina e α1-antiquimotripsina, inibem enzimas proteolíticas. As duas últimas também estimulam o crescimento fibroblástico e a produção de tecido conjuntivo necessário para o reparo e a resolução da lesão.

Um suprimento substancial de aminoácidos é necessário como substrato para este aumento na síntese proteica hepática, e esta é provenientes da proteólise do músculo esquelético. O TNF e a IL-1 estão novamente envolvidos, estimulando a degradação de proteínas intracelulares específicas pelo sistema ubiquitina-proteasoma (ver a seguir).

A magnitude da resposta da proteína de fase aguda está frequentemente ligada à gravidade do processo inflamatório ou infeccioso, tanto que medições seriais de proteínas de fase aguda no soro fornecem informações úteis sobre o progresso da doença e a resposta ao tratamento. As alterações na concentração sérica de CRP são quantitativamente as mais marcantes de todas as proteínas de fase aguda. Isto está ilustrado na Figura 4.9 (quadro da pág. 229). Suas concentrações podem aumentar por uma ou duas ordens de grandeza, a resposta é rápida e a proteína tem uma meia-vida curta. Estas propriedades e a facilidade relativa com a qual ela pode ser medida levaram a CRP a ser amplamente usada na prática clínica como um marcador laboratorial de infecção e inflamação (Caps. 4 e 38).

Condições clínicas associadas à s concentrações plasmáticas anormais de proteínas produzidas pelo fígado

A deficiência genética de α1-antitripsina apresenta-se na infância como uma doença hepática ou na idade adulta como uma doença pulmonar

A α1-antitripsina hepática pertence à s serpinas, uma das famílias dos inibidores serina proteases, e, ao contrário do seu nome, seu alvo predominante é a elastase derivada de macrófago. A deficiência genética da α1-antitripsina se apresenta na infância como doença hepática ou na idade adulta como doença pulmonar causada pela destruição tecidual mediada pela elastase; a gravidade da doença hepática é variável. Várias isoformas da α1-antitripsina existem como consequência da variação alélica; a isoforma normal é conhecida como M e as duas isoformas defeituosas comuns como S e Z; o alelo nulo não produz α1-antitripsina.

A deficiência genética da ceruloplasmina leva à doença de Wilson, uma condição associada aos danos hepático e no SNC

A ceruloplasmina é a principal proteína hepática e plasmática que contém cobre e funções como enzima oxidante de ferro (ferroxidase): oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} é necessária para a mobilização de ferro estocado, e a deficiência nutricional de cobre produz anemia. A doença de Wilson é uma condição associada a danos ao fígado e ao SNC. O fígado também sintetiza proteínas responsáveis pelo armazenamento (ferritina) e transporte (transferrina) do ferro (Caps. 4 e 22).

O câncer hepático está associado particularmente à s altas concentrações plasmáticas de α-fetoproteína

A α-fetoproteína (AFP) e a albumina têm sequência homóloga considerável, e parecem ter evoluído de um gene ancestral único. No feto, a AFP parece servir as funções fisiológicas semelhante à quelas realizadas pela albumina no adulto; além do mais, até o final do primeiro ano de vida, a AFP é totalmente substituída no plasma pela albumina. Durante a regeneração e proliferação hepática, a AFP é novamente sintetizada; logo as altas concentrações plasmáticas de AFP são observadas no câncer hepático.

Degradação proteica pelo sistema ubiquitina-proteasoma

A ubiquitina marca proteínas intracelulares para a degradação pelo proteasoma

O *turnover* de proteínas hepáticas é altamente controlado, o que permite vias metabólicas adapta-se à s mudanças das circunstâncias fisiológicas. As células dos mamíferos possuem vários sistemas proteolíticos.

As proteínas plasmáticas e os receptores de membrana são endocitados e então hidrolisados pelas proteases ácidas dentro de organelas intracelulares conhecidas como lisossomos. As proteínas intracelulares, por sua vez, são degradadas em estruturas conhecidas como proteasomas pelo então chamado sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) (Cap. 33). As descobertas da ubiquinilação proteica foram agraciadas com o Prêmio Nobel em química em 2003.

No UPS, a degradação proteica ocorre em duas fases. Primeira, a ubiquitina, uma proteína pequena (mw8,5 kDa), é acoplada aos grupamentos amino de resíduos lisil da proteína, e esta reação de conjugação é repetida para formar cadeias de cinco ou mais moléculas de ubiquitina ligadas à proteína. O processo envolve três enzimas: uma enzima ativadora de ubiquitina dependente de ATP (E1), uma enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e uma ligase ubiquitina-proteína (E3). A especificidade da degradação proteosômica depende da especificidade das enzimas responsáveis pela ligação da ubiquitina ao substrato proteico, e na presença de estruturas particulares desestabilizadoras na porção *N*-terminal da molécula proteica, tal como os resíduos fosforilados e hidroxilados. A propósito, a ubiquinação proteica à inibida pela acetilação. Na segunda fase, as proteínas ligadas à ubiquitina entram nos proteasomas, desenovelam-se e sofrem proteólise. O UPS é importante na ativação da via pró-inflamatória do NFκB e a função do UPS é modificada pelas espécies reativas de oxigênio (Cap. 37; Fig. 33.10).

O ciclo da ureia e amônia

O ciclo da ureia é essencial para a remoção do nitrogênio gerado pelo metabolismo de aminoácido

O catabolismo de aminoácidos gera amônia (NH_3) e íons amônio (NH_4^+). A amônia é tóxica, particularmente para o sistema nervoso central (SNC). A maior parte da amônia é detoxificada nos seus sítios de formação pela amidação de glutamato à glutamina, que é principalmente derivada do músculo e usada como uma fonte de energia pelos enterócitos. O nitrogênio remanescente entra pela veia porta ou como amônia ou como alanina, ambas usadas pelo fígado para a síntese de ureia (Cap. 19).

O comprometimento na excreção de amônia causa dano cerebral

O ciclo da ureia é a principal via pela qual o nitrogênio não aproveitado é excretado, como descrito no capítulo 19. Nos recém-nascidos, defeitos hereditários de algumas enzimas do ciclo da ureia levam à hiperamonemia, o que prejudica a função do cérebro, causando a condição conhecida como encefalopatia. Tais problemas surgem nas primeiras 48 horas de vida e, inevitavelmente, são agravadas pelos alimentos ricos em proteínas, tal como o leite (quadro clínico da pág. 243).

SÍNTESE DO HEME

O heme, um constituinte da hemoglobina, mioglobina e citocromos, é sintetizado na maioria das células do corpo. O fígado é a principal fonte não eritrocítica da sua síntese. O heme é uma porfirina, um composto cíclico que contém quatro anéis pirrólicos unidos por pontes de metileno. Ele é sintetizado da glicina e da succinil-coenzima A, que se condensam para formar o 5-aminolevulinato (5-ALA). Essa reação é catalisada pela 5-ALA sintase, localizada na mitocôndria, e é a etapa limitante da síntese do heme. Subsequentemente, no citosol, duas moléculas de 5-ALA se condensam para formar uma molécula contendo um anel pirrol, o porfobilinogênio (PBG). Assim, quatro moléculas PBG combinam-se para formar um composto tetrapirrólico linear que se cicliza para produzir o uroporfirinogênio III e, em seguida, o coproporfirinogênio III. As etapas finais da via ocorrem novamente na mitocôndria, onde uma série de descarboxilação e oxidação das cadeias laterais no uroporfirinogênio III produz a protoporfirina IX. Na etapa final, o ferro (Fe^{2+}) é adicionado pela ferroquelatase à protoporfirina IX para formar o heme. O heme controla a velocidade de sua síntese pela inibição da 5-ALA sintase (Fig. 29.3).

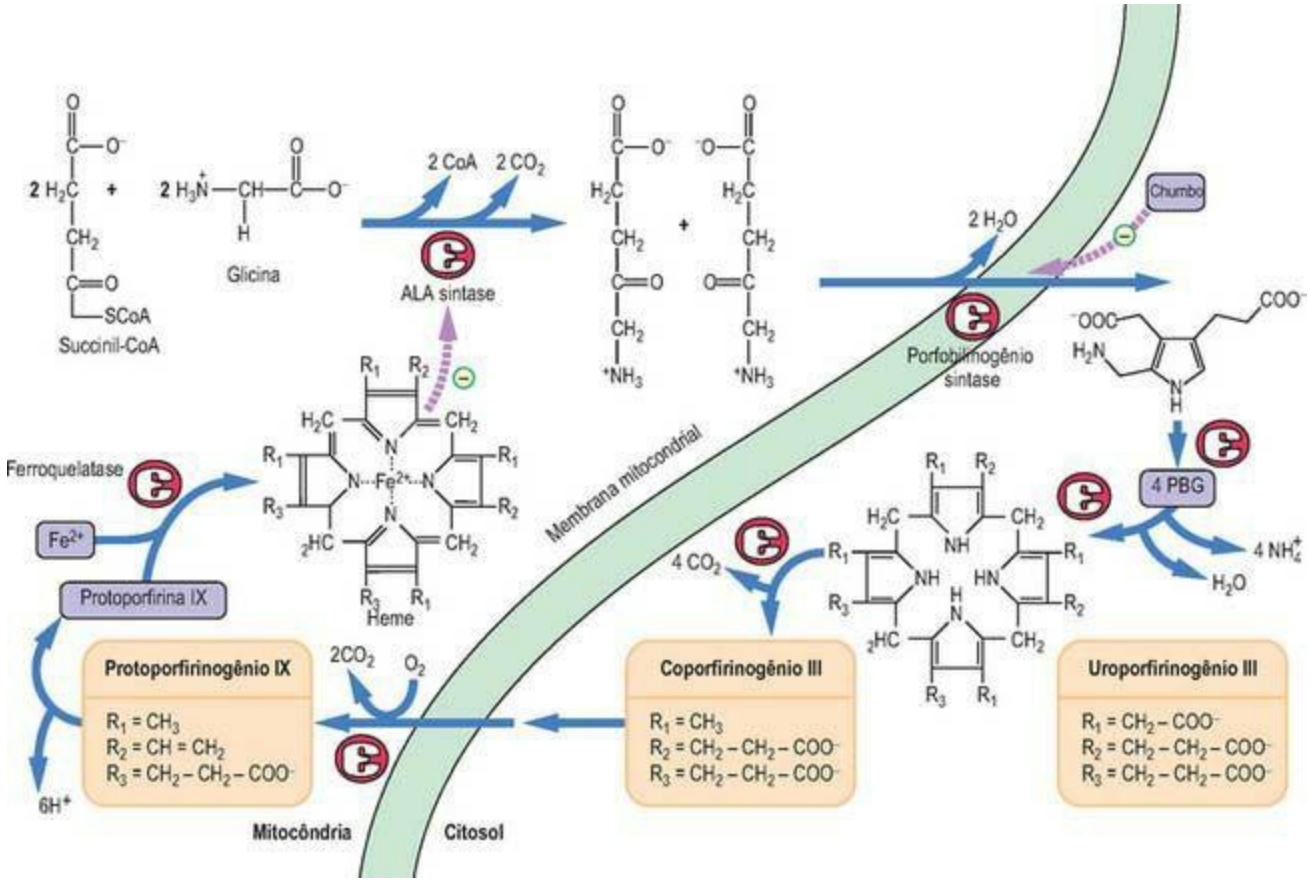


Fig. 29.3 A via de síntese do heme. Parte da via está localizada na mitocôndria e parte está no citosol. ALA, 5-aminolevulinato; PBG, porfobilinogênio. A hemoglobina é discutida no capítulo 4.

METABOLISMO DA BILIRRUBINA

Excesso de bilirrubina causa icterícia

A bilirrubina é o produto catabólico do heme. Cerca de 75% de toda a bilirrubina é derivada da hemoglobina das células vermelhas senescentes, que são fagocitadas pelas células mononucleares do baço, medula óssea e fígado. Nos adultos normais, o nível diário de bilirrubina é de 250-350 mg. A estrutura anelar do heme é clivada oxidativamente em biliverdina pela heme oxigenase, um citocromo P-450 (ver adiante). A biliverdina é, por sua vez, reduzida enzimaticamente a bilirrubina (Fig. 29.4). A concentração plasmática normal de bilirrubina é menor que 17 µmol/L (1,0 mg/dL). As concentrações aumentadas (maiores que 50 µmol/L ou 3 mg/dL) são rapidamente reconhecidas clinicamente, porque a bilirrubina dá a cor amarela à pele (icterícia). Anormalidades no metabolismo da bilirrubina são importantes indicadores no diagnóstico da doença hepática.

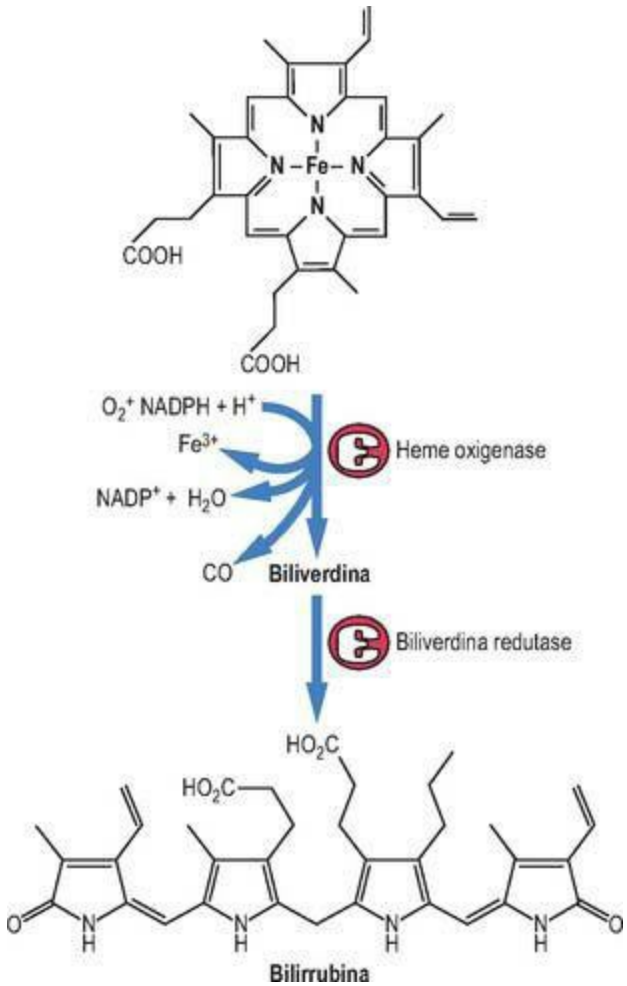


Fig. 29.4 Degradação do heme em bilirrubina.

PORFIRIAS: DOENÇAS QUE RESULTAM DE DEFEITOS NA SÍNTESE DO HEME

Defeitos na via de síntese do heme levam a distúrbios raros conhecidos como porfirias. As diferentes porfirias são causadas por deficiências de diferentes enzimas na via biossintética,

começando pela 5-ALA sintase e terminando com a ferroquelatase. As porfirias são classificadas como hepática ou eritropoética dependendo do órgão primário afetado.

Três porfirias são conhecidas como porfirias agudas e podem ser uma das causas de admissões emergenciais com dor abdominal (na qual necessita ser diferenciada de várias causas cirúrgicas). Elas também causam sintomas neuropsiquiátricos. A porfiria aguda intermitente (AIC) é causada pela deficiência da hidroximetilbilano sintase, uma enzima que converte o PBG em um tetrapirrol linear; neste distúrbio, as concentrações de 5-ALA e PBG aumentam no plasma e na urina.

A coproporfiria hereditária é devida a um defeito na conversão de coproporfirinogênio III em protoporfirinogênio III (coprooxidase). A terceira forma da porfiria aguda é a porfiria variegata, na qual as manifestações clínicas são muito similares à AIC. Outras porfirias, tal como a porfiria cutânea tardia, apresenta-se clinicamente como uma sensibilidade da pele à luz (fotossensibilidade) que pode causar desfiguração e formação de cicatriz. Além dissi, a via é inibida pelo chumbo na fase da porfobilinogênio sintase.

A bilirrubina é metabolizada pelos hepatócitos e excretada na bile

Enquanto a biliverdina é hidrossolúvel, a bilirrubina, paradoxicalmente, não é. Portanto, a maior parte deve ser metabolizada antes da excreção (Fig. 29.5). Isso ocorre no fígado, a bilirrubina é transportada no plasma ligada à albumina; a captação hepática de bilirrubina é mediada por um carreador e pode ser inibida competitivamente por outros ânions orgânicos. A hidrofilicidade da bilirrubina é aumentada pela esterificação de um ou ambos de seus ácidos carboxílicos das cadeias laterais com ácido glicurônico, xilose ou ribose. O diéster glicuronídeo é o principal conjugado e a sua formação é catalisada por uma uridina difosfato (UDP)-glicuronil transferase. A bilirrubina conjugada é então secretada pelo hepatócito dentro do canalículo biliar.

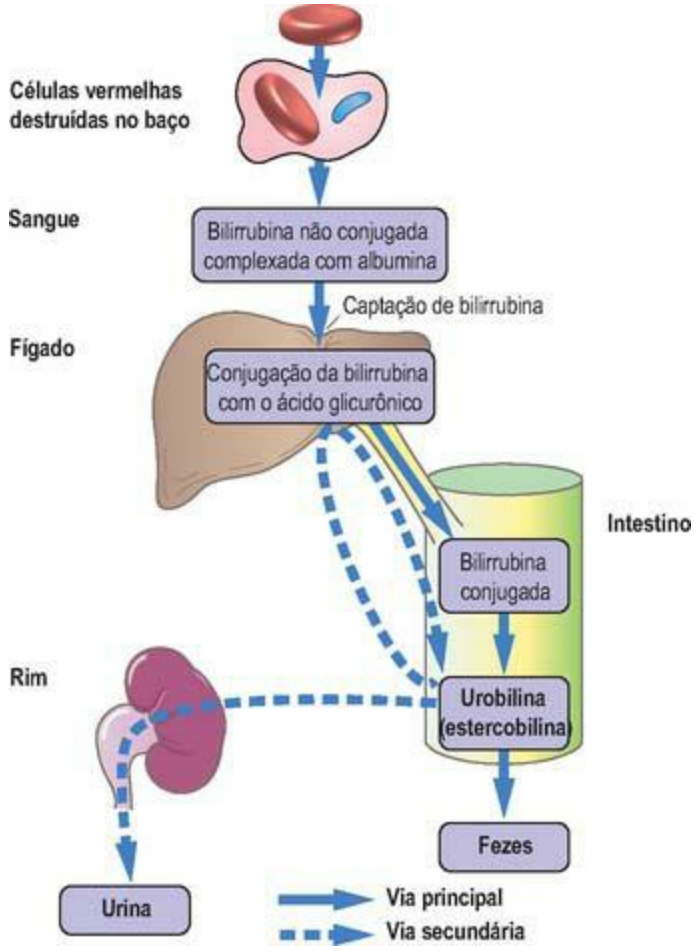


Fig. 29.5 Metabolismo normal da bilirrubina

A bilirrubina conjugada no intestino é catabolizada por bactéria para formar estercobilinogênio, também conhecido como urobilinogênio fecal, que é incolor. Na oxidação, contudo, o estercobilinogênio forma a estercobilina (também conhecida como urobilina fecal), que é colorida; a maior parte da estercobilina é responsável pela cor das fezes. Alguma estercobilina pode ser reabsorvida do intestino e então ser reexcretada ou pelo fígado ou pelos rins.

Ácidos biliares e metabolismo do colesterol

Os ácidos biliares são elementos-chave no metabolismo de gordura

Os ácidos biliares são sintetizados nos hepatócitos e têm um efeito semelhante ao detergente, solubilizando os lipídios biliares e emulsificando a gordura da dieta no intestino para facilitar sua digestão. Seu metabolismo está descrito nos Capítulos 10 e 17. A bile é também a única via de excreção do colesterol. Isso está descrito com detalhes nos Capítulos 17 e 18.

METABOLISMO DE DROGAS

A baixa especificidade de algumas enzimas hepáticas ao substrato produz ampla capacidade para o metabolismo de drogas

A maior parte das drogas é metabolizada pelo fígado. Entre outros efeitos, esse metabolismo hepático geralmente aumenta a hidrofilicidade das drogas e, portanto, sua capacidade de ser excretada. Em geral, os metabólitos que são produzidos são menos ativos farmacologicamente do que o substrato droga: no entanto, algumas pró-drogas inativas são convertidas em suas formas ativas como consequência do processamento hepático. Os sistemas hepáticos de metabolização de drogas precisam atuar numa infinidade de moléculas; isto é alcançado pelas enzimas envolvidas que têm baixa especificidade pelo substrato. O metabolismo ocorre em duas fases:

- **fase I – adição de grupo polar:** a polaridade da droga é aumentada pela oxidação ou hidroxilação catalisada por uma família de oxidases citocromo P-450 microssomais

- **fase II – conjugação:** as enzimas citoplasmáticas conjugam os grupos funcionais introduzidos nas reações da primeira fase mais frequentemente pela glicuronidação ou sulfação, e também acetilação e metilação.

Três das 12 famílias de genes do citocromo P-450 compartilham a responsabilidade pelo metabolismo de drogas

As enzimas citocromo P-450 são proteínas que contêm heme que estão justapostas com a fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH): citocromo P-450 redutase. Elas estão presentes no retículo endoplasmático. A maior parte do metabolismo associado à superfamília do citocromo P-450 acontece no fígado, mas estas enzimas estão também presentes no epitélio do intestino delgado. A sequência de reação catalisada por estas enzimas é mostrada na Figura 29.6. Existem 12 famílias de genes do citocromo P-450, das quais três, denominadas *CYP1*, *CYP2* e *CYP3*, são responsáveis pela maior parte da fase I do metabolismo de drogas. Na verdade, seis enzimas, CYP1A2, CYP3A, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP2E1, são responsáveis por aproximadamente 90% do metabolismo de drogas. A CYP3A é uma das enzimas citocromo P-450 mais importante e constitui cerca de 50% da sua atividade. Cada lócus genético tem múltiplos alelos.

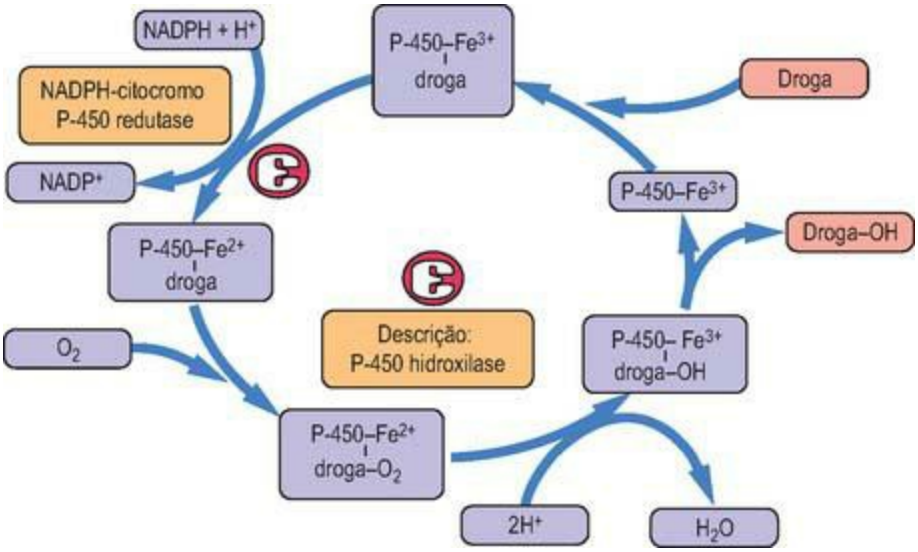


Fig. 29.6 Papel do sistema citocromo P-450 no metabolismo de drogas.

A indução e a inibição das enzimas citocromo P-450 são mecanismos de interações de drogas

A síntese de citocromos P-450 é induzida por certas drogas e outros agentes xenobióticos: isto aumenta a velocidade de reações da fase I. Por sua vez, as drogas que formam um complexo relativamente estável com o citocromo P-450 inibem o metabolismo de outras drogas, que são normalmente substratos para aquele citocromo. Por exemplo, a CYP1A2 metaboliza, entre outras, a cafeína e a teofilina. Isto pode ser inibido pelo suco de toranja, que contém uma substância conhecida como naringina, ou pelo antibiótico ciprofloxacina. Quando uma pessoa toma qualquer uma das substâncias inibidoras, os substratos normais para a CYP1A2 são metabolizados mais lentamente e seus níveis plasmáticos aumentam.

EXPLORAÇÃO TERAPÊUTICA DA INIBIÇÃO DA CYP3A

A droga ritonavir reduz o metabolismo mediado pela CYP3A de alguns dos inibidores da protease do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Isto aumenta os níveis desta droga no plasma. O efeito é explorado terapeuticamente pelo uso combinado de ritonavir e dos inibidores de protease no tratamento.

Durante a terapia imunossupressora, a dose da ciclosporina imunossupressora pode necessitar que seja reduzida até 75% se o paciente toma uma droga antifúngica cetoconazol (Wilkinson, em Leituras sugeridas). Isto pode precipitar reações adversas.

As drogas que levam a indução ou repressão das enzimas CYP3A frequentemente atuam por meio do mecanismo do receptor nuclear. Elas combinam-se com receptores nucleares (isto é, no caso da CYP3A4, o receptor X pregnano, PXR), que então formam heterodímeros com receptores X retinoides (Cap. 17). Tais complexos aumentam a síntese da CYP3 por ligação aos elementos-resposta no promotor do gene.

Os polimorfismos dos genes do citocromo P-450 determinam resposta a muitas drogas

A variação alélica que afeta a atividade catalítica do citocromo P-450 também afetará a atividade farmacológica das drogas. O melhor exemplo descrito de tal polimorfismo é aquele da

CYP2D6 do citocromo P-450, que foi reconhecido inicialmente em 5%-10% dos indivíduos normais, os quais foram notados ser lentos para debrisoquina hidroxilato, uma droga redutora de pressão sanguínea. que agora é pouco usada A CYP2D6 também metaboliza um número significativo de outras drogas comumente usadas, de modo que o "polimorfismo debrisoquina" continua significativo clinicamente.

A genotipagem dos citocromos P-450 para identificar os polimorfismos de genes relevantes podem indicar uma capacidade individual para metabolizar uma determinada droga. Ela identifica metabolizadores baixos, intermediários, extensos e ultrarrápidos de drogas. Tal genotipagem, juntamente com medidas de concentrações terapêuticas de drogas, é uma maneira de se prevenir reações adversas à s drogas. Estas medidas são agora frequentemente usadas, por exemplo, na cirurgia de transplante de órgão, onde a eficácia de drogas imunossupressoras é fundamental para o sucesso de um transplante.

As drogas que exercem seus efeitos tóxicos no fígado podem então fazê-lo pela produção hepática de um metabólito tóxico. A toxicidade medicamentosa pode ocorrer em todos os indivíduos expostos a uma concentração suficiente de uma droga particular. No entanto, uma droga pode ser tóxica em alguns indivíduos em concentrações normalmente toleradas pela maioria dos outros pacientes. Este fenômeno é conhecido como toxicidade medicamentosa idiossincrática e pode ser devido a uma causa genética ou imunológica.

A droga prescrita frequentemente acetaminofeno (paracetamol) em excesso é hepatotóxica

O acetaminofeno é amplamente usado como um analgésico. Tomado em doses terapêuticas usuais, ele é conjugado com o ácido glicurônico ou sulfato, que é então excretado pelos rins. Na *overdose*, a capacidade destas vias de conjugação é assoberbada e o acetaminofeno é oxidado pelo citocromo P-450 3A4 hepático em *N*-acetil benzoquinoneimina (NABQI), que pode causar a peroxidação dos lipídios de membrana mediada por radical livre e, consequentemente, um dano hepatocelular. O NABQI pode ser desintoxificado pela conjugação com a glutationa, mas na *overdose* de acetaminofeno, os estoques de glutationa também se tornam esgotados, causando hepatotoxicidade (Fig. 29.7). Terapeuticamente, um composto sulfidril, *N*-acetil cisteína (NAC), é frequentemente usado com um antídoto para o envenenamento por acetaminofeno. Ele promove a desintoxicação do NABQI pela via da glutationa e também retira os radicais livres. O risco de hepatotoxicidade pode ser fielmente predito da medição da concentração plasmática de acetaminofeno, a fim de que o NAC possa ser dado à queles pacientes com risco de dano hepático. A quantificação de paracetamol é desta maneira um dos exames emergenciais oferecidos pelos laboratórios clínicos.

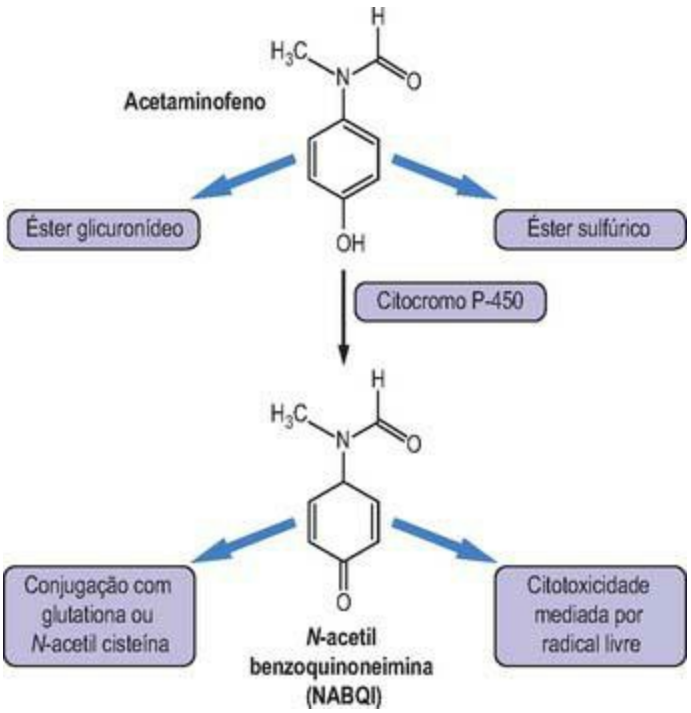


Fig. 29.7 Metabolismo de acetaminofeno (paracetamol).

O excesso de álcool é a principal causa de doença hepática

A ingestão excessiva de álcool etílico continua sendo a causa mais comum de doença hepática no mundo ocidental (quadro da pág. 401). O etanol pode causar hepatite alcoólica, esteatose devido à deposição de gordura, ou finalmente fibrose (conhecida como cirrose), que, por sua vez, leva à falência hepática. Existem mais de 25.000 mortes anualmente associadas à doença hepática nos Estados Unidos, e 40% delas estão relacionadaos à cirrose alcoólica (Donohue em Leituras sugeridas). As características microscópicas da cirrose alcoólica são mostradas na Figura 29.8.

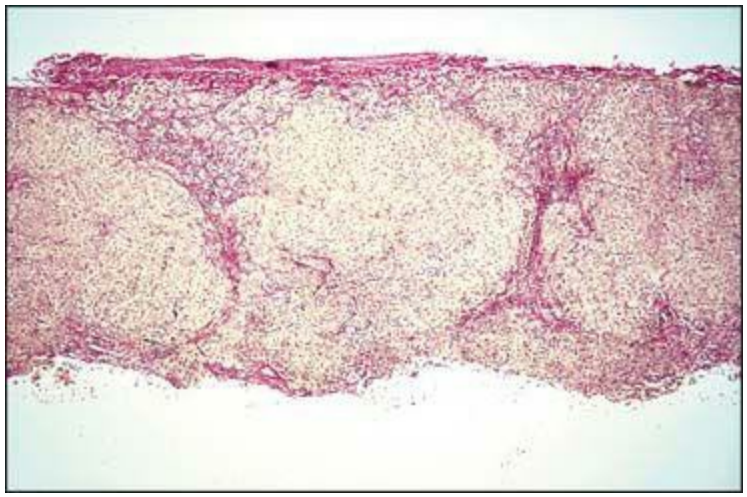


Fig. 29.8 Uma lâmina histológica de um fígado cirrótico.

(Cortesia de Dr. J. Newman, Birminghan Heartlands and Solihull NHS Trust, UK.)

O etanol é oxidado no fígado, principalmente pela álcool desidrogenase, para formar acetaldeído, que é, por sua vez, oxidado pela aldeído desidrogenase (ALDH) em acetato. A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) é o cofator para ambas as oxidações, sendo reduzida a NADH. Um citocromo P-450, CYP2E1, também contribui para a oxidação do etanol, mas é quantitativamente menos importante do que a via da álcool desidrogenase-ALDH. O dano hepático nos pacientes que abusam do álcool pode surgir da toxicidade do acetaldeído, que forma adutos-base de Schiff com outras macromoléculas.

Como resultado da oxidação do etanol, aumenta a relação de NADH/NAD^+ e altera o potencial redox do hepatócito. Isso inibe a oxidação do lactato a piruvato (um passo que requer NAD^+ como cofator). Cria-se um potencial para o desenvolvimento da acidose láctica e, já que o piruvato é um substrato para gliconeogênese hepática, existe também um risco de hipoglicemia. O risco de hipoglicemia é aumentado nos alcoólatras quando se abstêm. Por causa dá má nutrição, eles têm frequentemente baixos estoques de glicogênio hepático (quadro clínico da pág. 168). Também, a mudança na proporção de NADH/NAD^+ inibe a β-oxidação de ácidos graxos e promove a síntese de triglicerídeos: seu excesso é depositado no fígado (esteatose hepática) e secretado no plasma como VLDL (quadro clínico da pág. 199). A esteatose hepática pode ser facilmente diagnosticada por ultrassonografia do fígado quando se vê um aumento uniforme da ecogenicidade (Fig. 29.9). Isto está

associado à elevação dos níveis séricos de enzimas transaminases (ver adiante), que são importantes marcadores laboratoriais de doença hepática.



Fig. 29.9 Uma ultrassonografia de um fígado mostrando esteatose.

(Cortesia de Dr. A. Bannerjee, Birminghan Heartlands and Solihull NHS Trust, UK.)

O consumo de etanol também afeta o sistema ubiquitina de degradação proteica. O consumo crônico de álcool diminui a atividade proteasômica. Isso pode desregular a sinalização do hepatócito pela inibição do transdutor de sinal Janus e a ativação da via do fator de transcrição (JAK-STAT) (Cap. 40). A via JAK-STAT está envolvida na resposta de fase aguda, defesa antiviral e reparo hepático e inflamação, e sua inibição pode contribuir para o desenvolvimento de doença hepática alcoólica. A inibição da atividade proteasômica também pode levar ao aumento de apoptose (Cap. 43), uma característica da doença hepática alcoólica. A redução da atividade proteasômica induzida por álcool impede a degradação do CYP2E1, que está envolvido nas reações de peroxidação: isso aumenta o estresse oxidativo e pode ser outro fator de contribuição para a doença hepática alcoólica.

ANTECEDENTES BIOQUÍMICOS PARA HEPATOMEGALIA

A redução na atividade proteasômica induzida por álcool pode levar ao acúmulo de proteína no fígado, que, por sua vez, causa uma dilatação do fígado (hepatomegalia, comum em doença hepática alcoólica). Outro fenômeno induzido por etanol inclui o aumento na secreção de quimiocinas (incluindo IL-8 e proteína 1 quimioatrativa de monócitos [MCP-1; Cap. 18]) por hepatócitos, levando à infiltração hepática por neutrófilos.

ACETAMINOFENO E INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA

Uma mulher de 22 anos de idade foi admitida no hospital em estado de semiconsciência. Ela tinha sido encontrada com um bilhete suicida e com recipientes vazios de acetaminofeno. Os exames

mostraram aspartato aminotransferase (AST) 5.500 U/L, fosfatase alcalina (ALP) 125 U/L, bilirrubina 70 µmol/L (4,1 mg/dl), tempo de protrombina 120 seg (valor normal: 10-15 s), creatinina 350 µmol/L (4,0 mg/dL; taxa normal: 20-80 µmol/L, 0,28-0,90 mg/dL), glicose 2,6 mmol/L (47 mg/dl; taxa normal: 4,0-6,0 mmol/L, 72-109 mg/dL), e sangue com pH 7,1. Nenhum acetaminofeno foi encontrado no seu plasma.

Comentário. A paciente tinha falência hepática aguda, mais provavelmente causada pelo envenenamento por acetaminofeno. O acetaminofeno sanguíneo pode não ser detectável se o paciente recebe a primeira assistência médica 24 horas depois de uma *overdose*. O dano hepatocelular piora nas primeiras 72 horas, mas pode melhorar espontaneamente após esse tempo, como resultado da regeneração dos hepatócitos. No entanto, nos pacientes com acidose metabólica, aumenta acentuadamente os tempos da protrombina ou creatinina sérica > 300 µmol/L (3,4 mg/dL), a mortalidade é muito alta e o transplante de fígado pode ser necessário. Para obter os valores de referência, consulte a Tabela 29.2.

Tabela 29.2 Urn painel de exames laboratoriais é essencial no diag-nóstico diferencial da icterícia. Os níveis de referênda para os exames de função hepática são os seguintes: AST (aspartato aminotransferase) 10-40 U/L, ALT (alanina aminotransferase) <50 U/L, ALP (fosfatase alca-lina) 50-260 (ALP é fisiologicamente elevada em crianças e adolescentes), bilirrubina <17 umol/L (<1,0 mg/dL), albumina 36-52 g/L (3,6-5,2 g/dL), γ-glutamil transpeptidase: homens <90 U/L, mulheres, < 50 U/L.

Exame	Pré-hepática	Intra-hepática	Pós-hepática
Bilirrubina conjugada	ausente	aumentada	aumentada
AST ou ALT	normal	aumentada	normal
ALP	normal	normal	aumentada
Bilirrubina na urina	ausente	presente	presente
Urobilinogênio na urina	presente	presente	ausente

Sintomas de intolerância ao álcool são explorados para fortalecer a abstinência

A álcool desidrogenase e a ALDH são ambas sujeitas a polimorfismos genéticos, que têm sido investigados como uma base potencial herdada de suscetibilidade ao alcoolismo e à doença hepática alcoólica. A posse do alelo ALDH2 [2], que codifica uma enzima com atividade catalítica reduzida, leva ao aumento das concentrações de acetaldeído plasmático após a ingestão de álcool. Isso causa ao indivíduo uma experiência desagradável de rubor e sudorese, que desencoraja o alcoolismo. O disulfiram, uma droga que inibe a ALDH, também causa estes sintomas quando o álcool é tomado, e pode ser dado para fortalecer a abstinência ao álcool.

FARMACOGENÔMICA

A resposta a muitas drogas particulares será influenciada pelas propriedades cinéticas da droga (farmacocinética) e seus efeitos (farmacodinâmica). Uma resposta individual a droga pode ser influenciada pelos genes que codificam enzimas metabolizadoras de drogas, receptores e transportadores. Muitas variabilidades nesses genes podem levar a diferenças interindividuais na resposta à quela droga.

A eficácia e a segurança da terapia medicamentosa, particularmente em pacientes idosos cuja capacidade metabólica está reduzida, são atualmente o principal problema. Aproximadamente 3% das admissões hospitalares nos Estados Unidos estão relacionadas à s interações droga-droga e um estudo holandês relatou valores maiores que 8,4%. Nos Estados Unidos, existem anualmente 2 milhões de casos de reações adversas a drogas, incluindo 100.000 mortes. Combinado com o fato de que as drogas são mais eficazes em apenas 25%-60% dos pacientes aos quais são prescritas, torna-se absolutamente essencial a investigação da resposta individual à s drogas.

A farmacogenômica estuda os efeitos da heterogeneidade genética na eficácia medicamentosa

Uma vez que o fígado tem um papel central no metabolismo de drogas, a farmacogenômica de algumas enzimas hepáticas que metabolizam drogas, especificamente as oxidases citocromo P-450, é clinicamente muito relevante. A *CYP2D6* é responsável pelo metabolismo de mais de 100 fármacos, e um polimorfismo desta enzima é responsável pela variação estabelecida a longo prazo no metabolismo da debrisoquina, anteriormente mencionada. Os pacientes são classificados como metabolizadores de debrisoquina ultrarrápido, extenso, intermediário e fraco. Existe um lócus genético *CYP2D6*, e indivíduos podem ter dois, um ou nenhum alelo funcional correspondendo aos metabolizadores extenso, intermediário e baixo, respectivamente; a multiplicação do gene pode levar a três alelos funcionais e ao fenótipo de metabolizador ultrarrápido. Setenta e cinco variantes alélicas da *CYP2D6* têm sido identificadas e técnicas farmacogenéticas podem identificar o fenótipo metabolizador, assim predizendo a resposta clínica ao tratamento. Embora a debrisoquina agora seja obsoleta, o polimorfismo da *CYP2D6* é relevante para muitas drogas usadas nas práticas cardíaca e psiquiátrica. Por exemplo, os metabolizadores fracos são provavelmente mais suscetíveis à intoxicação por drogas que outros indivíduos, e pouco provavelmente capazes de se beneficiar do analgésico codeína, uma pró-droga que é metabolizada pela *CYP2D6* a morfina, a droga ativa. Um polimorfismo da *CYP2C19* novamente leva a fenótipos de metabolizadores extenso e fraco, afeta o metabolismo das drogas inibidoras da bomba de prótons, usadas na doença do refluxo gastroesofágico, e a eficácia do tratamento (Cap. 8).

DOENÇA HEPÁTICA RELACIONADA AO ÁLCOOL

Um empresário de 45 anos de idade fez um exame médico de rotina, no qual foi encontrada ligeira dilatação do fígado. Os exames mostraram bilirrubina 15 μmol/L (0,9 mg/dL), AST 434 U/L, ALT 198 U/L, ALP 300 U/L, γ-glutamil transpeptidase (γGT) 950 U/L, e albumina 40 g/L (4 g/dL). Ele parecia perfeitamente bem.

Comentário. O paciente tem doença hepática. Os exames bioquímicos mostram evidência de

dano hepatocelular. A concentração aumentada de γGT é um dos índices mais sensíveis de ingestão excessiva, mas pode haver também glóbulos vermelhos aumentados (macrocitose) e aumento da concentração sérica de ácido úrico. Os pacientes podem negar alcoolismo. Uma biópsia hepática pode ser necessária para o diagnóstico. Nesse paciente, o exame microscópico do tecido mostrou alterações características de esteatose alcoólica, hepatite e fibrose central. Este pode ser o precursor da cirrose e o paciente deve se abster do álcool. Outras causas, tais como a infecção viral crônica do fígado ou uma hepatite crônica autoimune ativa, podem ser detectadas pelos exames de sangue. Para obter os valores de referência, consulte a Tabela 29.2. (Compare com o quadro da pág. 168.)

GENÔMICA DE DOENÇAS HEPÁTICAS

Poucas doenças hepáticas surgem devido à desordem de um único gene e técnicas genéticas podem identificar aqueles com uma propensão para o desenvolvimento da doença ou confirmar o diagnóstico em indivíduos afetados.

A hemocromatose hereditária é um distúrbio do metabolismo do ferro geneticamente determinado, comum no norte da Europa, com uma prevalência populacional de 1 em 200 a 1 em 300. Os pacientes absorvem quantidades excessivas de ferro pelo intestino, e a quantidade excessiva de ferro tecidual leva à disfunção múltipla dos órgãos, incluindo a cirrose hepática. Uma glicoproteína transmembrana, conhecida como HFE, modula a captação de ferro. Mutações no lócus genético que codifica esta proteína, o gene HFE, constituem a base para a hemocromatose hereditária. Dois pontos de mutações, *C282Y* e *H63D*, são encontrados na maioria daqueles com hemocromatose hereditária e podem ser identificados facilmente pelos métodos baseados em PCR. A deficiência de α1-antitripsina (AA1T) leva ao aparecimento precoce da doença pulmonar e à cirrose hepática. Mais do que 90 variantes alélicas do gene AA1T, no assim chamado Pi ou lócus do inibidor da proteinase, têm sido descritas, a maioria das quais não afeta os níveis plasmáticos ou a atividade do AA1T. As variantes fenotípicas na AA1T foram inicialmente descritas por sua mobilidade relativa na eletroforese, com a variante mais comum, M, tendo mobilidade intermediária. As variantes Z e S são mais frequentemente associadas à deficiência de AA1T, e são ambas devidas à s mutações pontuais que podem também ser detectada pelos ensaios de PCR. A doença de Wilson, outra causa hereditária da cirrose devido ao excesso na deposição de cobre no fígado, é também causada por um defeito único gênico, mas múltiplas mutações têm sido encontradas em pacientes afetados; nenhuma técnica de rotina está disponível para o diagnóstico. A doença de Gilbert (ver adiante) é causada por um polimorfismo de um dinucleotídico na TATA box do promotor (Fig. 34.1) do gene da bilirrubina UDP-glicuronil transferase, que prejudica a captação hepática de bilirrubina não conjugada.

TESTES BIOQUÍMICOS DE FUNÇÃO HEPÁTICA

Os laboratórios clínicos oferecem um painel de medições em amostras de plasma ou soro (Tabela 29.2). Este grupo de exames é geral, e incorretamente, descrito como exames de "função" hepática. Os exames frequentemente incluem as medições de:

- bilirrubina
- albumina
- aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)
- fosfatase alcalina (ALP)
- γ-glutamil transferase (γGT).

Os níveis de referência para esses exames são dados na legenda da Tabela 29.2.

As atividades plasmáticas das enzimas hepáticas são marcadores de doença hepática, e a síntese de protrombina é um bom indicador da função hepática de síntese.

Transaminases

A aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransaminase (ALT) estão envolvidas na interconversão do amino e cetoácidos, e são necessárias para o metabolismo do nitrogênio e carboidratos (Cap. 19). Ambas estão localizadas na mitocôndria; a ALT também é encontrada no citoplasma. A atividade sérica da ALT e da AST aumenta na doença hepática (ALT é a medida mais sensível). Na doença hepática, as funções sintéticas dos hepatócitos são prováveis de ser afetadas, e então seria esperado que o paciente tivesse um tempo de protrombina prolongado e uma baixa concentração de albumina sérica.

Fosfatase alcalina (ALP)

A ALP é sintetizada pelo trato biliar e pelo osso, mas esses dois tecidos contêm diferentes isoenzimas ALP. A origem da ALP pode ser determinada do padrão da isoenzima. Alternativamente, a atividade plasmática de uma outra enzima, tal como γ-glutamil transpeptidase (GGP), que também se origina no trato biliar, pode ser medida.

CLASSIFICAÇÃO DE DISTÚRBIOS HEPÁTICOS

Doença hepatocelular

A doença inflamatória do fígado é denominada hepatite e pode ser de curta (aguda) ou longa (crônica) duração. Infecções virais, particularmente as hepatites A, B e C, são causas infecciosas de hepatite aguda, enquanto o álcool e o acetaminofeno são as causas toxicológicas mais comuns. A hepatite crônica, definida como uma inflamação que persiste por mais do que seis meses, pode também ser devida aos vírus da hepatite B e C, álcool, e doenças imunológicas nas quais o corpo produz anticorpos contra os seus próprios tecidos (doenças autoimunes, Cap. 38). A cirrose é o resultado da hepatite crônica e é caracterizada microscopicamente pela fibrose dos lóbulos hepáticos. O termo "falência hepática" indica uma condição clínica em que a função bioquímica do fígado é grave e fatalmente comprometida.

Doença colestática

A colestase é o termo clínico para obstrução biliar, que pode ocorrer nos pequenos ductos biliares do próprio fígado ou nos ductos maiores extra-hepáticos. Os exames bioquímicos não podem distinguir entre estas duas possibilidades, que geralmente têm causas totalmente diferentes; técnicas de imagens, tais como a ultrassonografia, são mais úteis.

Icterícia

A icterícia pode ser pré, pós ou intra-hepática

A icterícia é óbvia clinicamente quando as concentrações de bilirrubina plasmática excedem 50 µmol/L (3 mg/dL) (Tabela 29.2). A hiperbilirrubinemia é o resultado de um desequilíbrio entre a sua produção e a sua excreção. As causas da icterícia (Tabela 29.3) são convencionalmente classificadas como:

- **pré-hepática:** aumento na produção de bilirrubina (Fig. 29.10)
- **intra-hepática:** insuficiência hepática na captação, conjugação ou secreção de bilirrubina (Fig. 29.11).
- **pós-hepática:** obstrução da drenagem biliar (Fig. 29.12 e quadro da pág. 212).

Tabela 29.3 Causas da icterícia.

Tipo	Causa	Exemplo clínico	Frequência
Pré-hepática	hemólise	autoimune	incomum
		hemoglobina anormal	depende da região
Intra-hepática	infecção	hepatites A, B, C	comum/muito comum
	química/droga	acetaminofeno	comum
		álcool	comum
	erros genéticos:	síndrome de Gilbert	1 em 20
	bilirrubina	síndrome de Crigler-Najjar	muito raro
	metabolismo	síndrome de Dubin-Johnson	muito raro
		síndrome de Rotor	muito raro
	erros genéticos:	doença de Wilson	1 em 200.000
	proteínas específicas	α1 antitripsina	1 em 1.000 com genótipo
	autoimune	hepatite ativa crônica	incomum/ rara
	neonatal	fisiológica	muito comum
Pós-hepática	ductos biliares intra-hepáticos	drogas cirrose biliar primária	comum incomum
		colangite	comum
	ductos biliares extra-hepáticos	cálculos vesiculares tumor pancreático	muito comum incomum
		colangiocarcinoma	raro

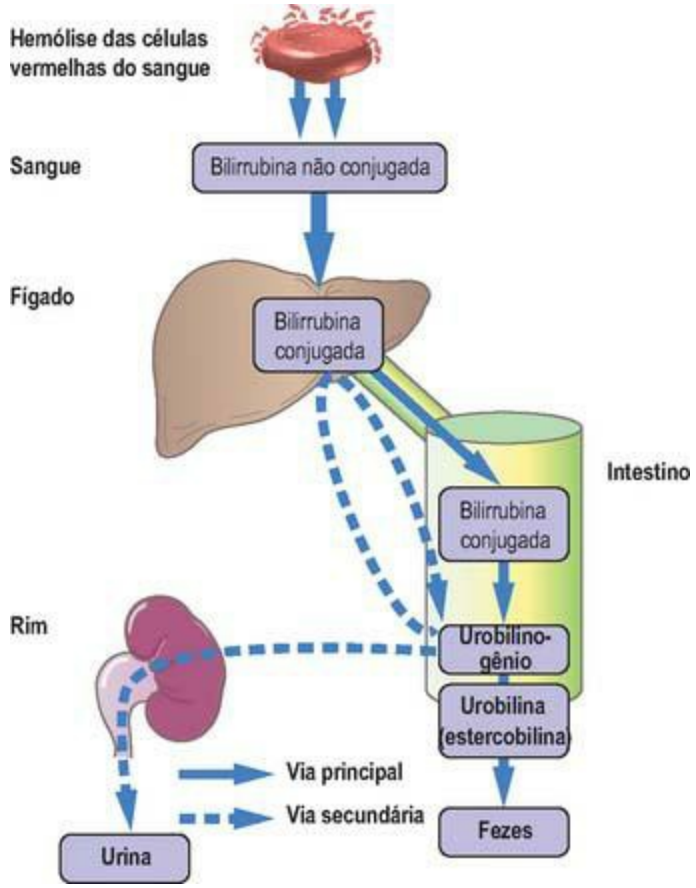


Fig. 29.10 Icterícia pré-hepática (hemolítica). Existe um aumento na concentração de bilirrubina total plasmática pelo excesso de fração não conjugada (Tabela 29.2).

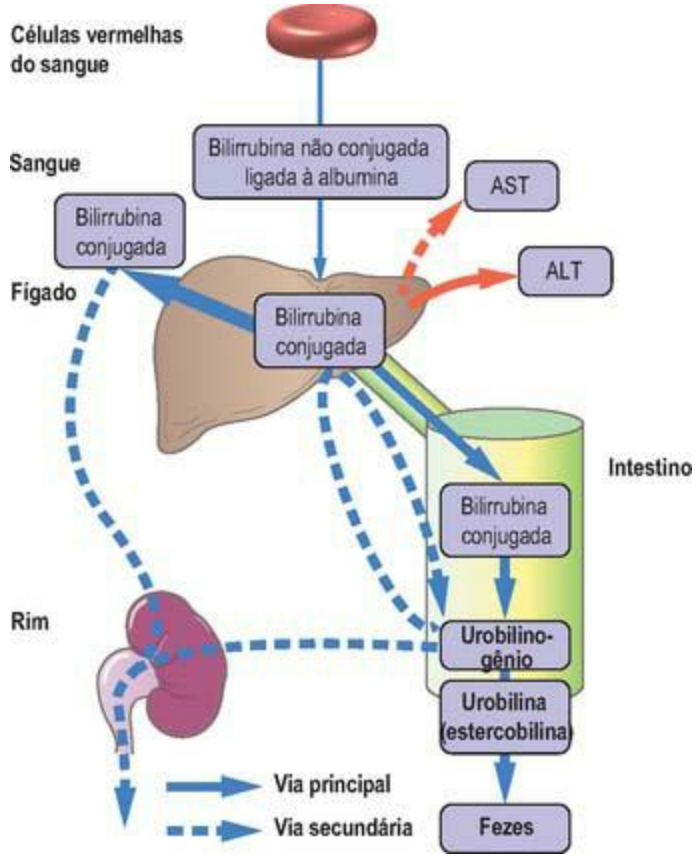


Fig. 29.11 Icterícia intra-hepática. A bilirrubina no plasma está aumentada devido ao aumento na fração conjugada. O aumento das atividades enzimáticas no soro significa dano hepático (Tabela 29.2).

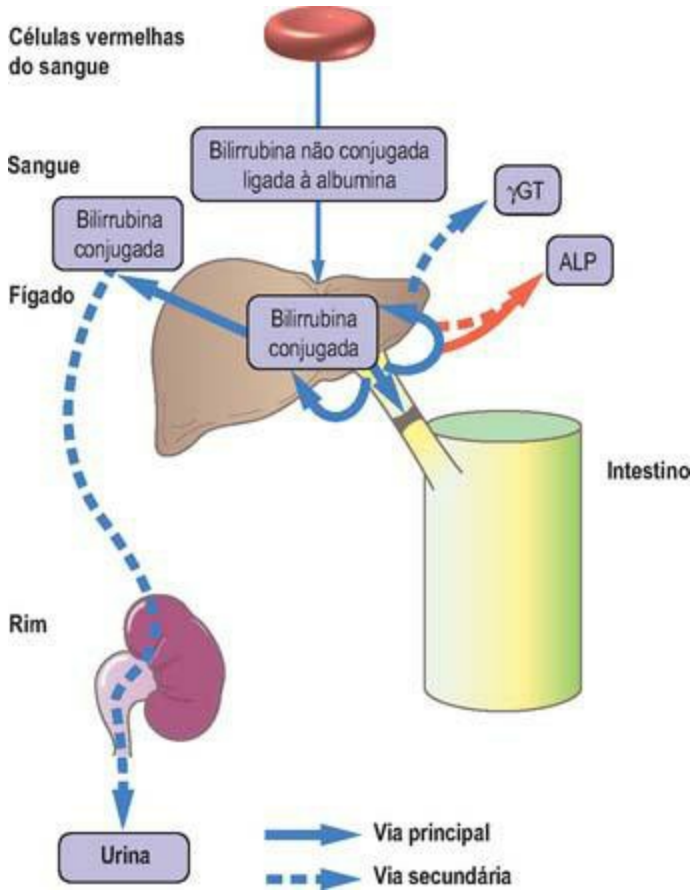


Fig. 29.12 Icterícia pós-hepática. A bilirrubina plasmática está elevada devido ao aumento na fração conjugada. A obstrução do ducto biliar não permite a passagem de bile para o intestino. As fezes são caracteristicamente de cor pálida. (Tabela 29.2). γ GT, γ - glutamil transpeptidase; ALP, fosfatase alcalina.

A icterícia pré-hepática resulta da produção excessiva de bilirrubina como consequência de hemólise, ou uma anormalidade genética na captura hepática da bilirrubina não conjugada. A hemólise é frequentemente o resultado de doença imune, presença de células vermelhas estruturalmente anormais ou a degradação do sangue extravasado. A hemólise intravascular libera hemoglobina no plasma, onde ela é oxidada em meta-hemoglobina (Cap. 5) ou complexada com a haptoglobina. Mais frequentemente, células vermelhas são hemolisadas extravascularmente, dentro de fagócitos, e a hemoglobina é convertida em bilirrubina; essa bilirrubina não é conjugada. As bilirrubinas não conjugada e conjugada podem ser quimicamente distinguidas.

A icterícia intra-hepática reflete uma disfunção generalizada dos hepatócitos. Nesta condição, a hiperbilirrubinemia é geralmente acompanhada por outras alterações nos marcadores bioquímicos da função hepatocelular.

Em recém-nascidos, a icterícia passageira é comum, particularmente em prematuros, e é devido à imaturidade das enzimas envolvidas na conjugação da bilirrubina. A bilirrubina não conjugada é tóxica para o cérebro imaturo e causa uma condição conhecida de kernicterus. Se as concentrações de bilirrubina plasmática são julgadas muito altas, a fototerapia com luz azul-branca, a qual isomeriza a bilirrubina a muitos pigmentos solúveis que devem ser excretados com a bile, ou a transfusão sanguínea para remover o excesso de bilirrubina são necessárias para evitar o kernicterus.

IMPORTÂNCIA DA ICTERÍCIA NEONATAL

Um bebê a termo normal desenvolveu icterícia no terceiro dia de vida com uma concentração de bilirrubina de 150 μmol/L (8,8 mg/dL), predominantemente da forma indireta. O bebê estava de resto bem.

Comentário. Cerca de 50% dos bebês normais tornam-se ictéricos 48 horas após o nascimento. Esta icterícia fisiológica é causada pela ineficiência temporária na conjugação de bilirrubina, e se resolve nos primeiros 10 dias. A hiperbilirrubinemia é de natureza não conjugada; se grave, pode requerer fototerapia (luz ultravioleta para a fotoisomerização da bilirrubina numa forma não tóxica) ou transfusão de sangue para impedir dano ao cérebro (kernicterus). Feridas de parto, infecção ou baixa ingesta de fluido pode aumentar a hiperbilirrubinemia. A icterícia nas primeiras 24 horas de vida é anormal e requer investigação para exclusão de hemólise, tal como a icterícia fisiológica grave suficiente para necessitar de fototerapia. A icterícia que se apresenta mais tarde, após 10 dias, é sempre anormal e é provável indicar um erro congênito do metabolismo ou defeitos estruturais nos ductos biliares.

A icterícia pós-hepática é causada pela obstrução da árvore biliar. A bilirrubina plasmática é conjugada e outros metabólitos biliares, tais como os ácidos biliares, acumulam-se no plasma. Os aspectos clínicos são fezes pálidas, causadas pela ausência de bilirrubina e urobilina fecal, e urina escura como resultado da presença de bilirrubina conjugada hidrossolúvel. Na obstrução completa, o urobilinogênio e a urobilina estão ausentes da urina, como pode não haver conversão intestinal da bilirrubina a urobilinogênio/urobilina, e por isso nenhuma excreção renal de urobilinogênio/urobilina reabsorvida.

DOENÇA HEPÁTICA OBSTRUTIVA CAUSADA POR CÂNCER PANCREÁTICO

Um homem de 65 anos de idade foi admitido no hospital por causa de icterícia. Não existia dor abdominal, mas ele tinha notado a urina escura e as fezes pálidas. A vesícula biliar parecia palpável, mas não macia. Os exames de função hepática mostraram bilirrubina 230 μmol/L (13,5 mg/dL), AST 32 U/L e ALP 550 U/L. O teste de urina de vareta revelou a presença de bilirrubina, mas não de urobilina.

Comentário. O paciente tinha um histórico típico de icterícia obstrutiva. O aumento de ALP e as concentrações normais de AST foram compatíveis com isso, e a ausência de urobilina na urina indicou que o trato biliar estava obstruído. Foi importante realizar investigações do fígado por imagens para encontrar o local da obstrução; a ausência de dor sugeriu que cálculos na vesícula não eram a causa. A ultrassonografia mostrou dilatação do ducto biliar e a tomografia computadorizada mostrou uma massa na cabeça do pâncreas. Durante a cirurgia, o câncer no pâncreas foi confirmado. Para as faixas de referência, ver Tabela 29.2.

Causas genéticas da icterícia

Existem inúmeros distúrbios genéticos que prejudicam a conjugação e secreção da bilirrubina. A síndrome de Gilbert, que afeta até 5% da população, causa uma moderada hiperbilirrubinemia não conjugada, que é inofensiva e assintomática. Isto é devido a uma modesta redução na atividade da uridina difosfato (UDP) glucuronil transferase.

Outras doenças hereditárias do metabolismo de bilirrubina são raras. A síndrome de Crigler-Najjar, que é resultado da ausência completa ou redução acentuada na conjugação de bilirrubina, causa uma hiperbilirrubinemia não conjugada grave que se apresenta no nascimento; quando a enzima está completamente ausente, a condição é fatal. As síndromes de Dubin-Johnson e a de Rotor prejudicam a secreção biliar da bilirrubina conjugada e, portanto, causam uma hiperbilirrubinemia conjugada que é geralmente branda.

Resumo

- O fígado exerce um papel central no metabolismo humano.
- Ele está intensamente envolvido na síntese e no catabolismo de carboidrato, lipídios e proteínas.
- Ele sintetiza um leque de proteínas de fase aguda em resposta a inflamação e infecção, e medições laboratoriais destas proteínas são clinicamente úteis no acompanhamento do progresso da doença.
- Ele está envolvido no metabolismo de bilirrubina derivada do catabolismo do heme.
- Os processos patológicos frequentemente fazem com que o paciente apresente icterícia devido à hiperbilirrubinemia.
- O fígado tem um papel central na desintoxicação de drogas.
- Sua função bioquímica é avaliada na prática clínica utilizando um painel de exames de sangue, chamados exames de função hepática, anormalidades das quais podem apontar para doenças que afetam os sistemas hepatocelular ou biliar.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Discuta como a posição anatômica e a estrutura do fígado permitem absorver e metabolizar lipídio, proteína e carboidrato, assim como xenobióticos do intestino, antes da liberação destas moléculas ou de seus derivados na circulação sistêmica.

2. Descreva a função do fígado na síntese de proteína e a resposta sistêmica a inflamação.

3. Esboce como o fígado processa a bilirrubina, e descreva as causas bioquímicas da hiperbilirrubinemia (icterícia) e sua classificação.

4. Como o fígado metaboliza as drogas?

5. Discuta os exames bioquímicos usados pelo laboratório clínico na investigação de doença hepática.

Leituras sugeridas

Donohue TM, Cederbaum AI, French SW. Role of the proteasome in ethanol-induced liver pathology. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31:1446-1459.

Wijnen PAHM, Op den Buijsch RAM, Drent M, et al. Review article: the prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(suppl2):211-219.

Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med*. 2005;352:2211-2221.

D. Zakim, TD Boyer, editors. Hepatology. A textbook of liver disease, 4th edn, Philadelphia: Saunders, 2002.

Sites

www.nlm.nih.gov/medlineplus www.nlm.nih.gov/medlineplus/liverdiseasesgeneral.html

www.labtestsonline.org www.labtestsonline.org/understanding/conditions/liver_disease.html

Citocromo P-450. http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html.

www.imm.ki.se www.imm.ki.se

Farmacogenômica Farmacogenômica. www.pharmgkb.org/index.jsp.

Biossíntese e Degradação de Nucleotídeos

A. Gugliucci

R. Thornburg

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Comparar e contrastar a estrutura e a biossíntese de purinas e pirimidinas, destacando as diferenças entre as vias *de novo* e de recuperação.

- Descrever como as células suprem suas necessidades de nucleotídeos nos vários estágios do ciclo celular.

- Explicar a lógica bioquímica para o uso de fluorouracil e metotrexato em quimioterapia.

- Descrever a base metabólica e o tratamento de doenças clássicas do metabolismo de nucleotídeos: gota, síndrome de Lesch-Nyhan e SCIDS.

INTRODUÇãO

Os nucleotídeos, moléculas compostas de uma pentose, uma base nitrogenada e fosfato, são elementos-chave na fisiologia celular, uma vez que são:

- Precursores de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA).
- Componentes de coenzimas, por exemplo, NAD(H), NADP(H), FMN(H2) e CoA.
- Unidades de energia, conduzindo muitos processos metabólicos, por exemplo, ATP e GTP.
- Carreadores nas biossínteses, por exemplo, UDP para carboidratos e CDP para lipídeos.
- Moduladores de regulação alostérica do metabolismo.
- Mensageiros secundários, por exemplo, cAMP e cGMP.

Podemos sintetizar grandes quantidades de nucleotídeos de purina e pirimidina intermediários metabólicos. Dessa forma, embora ingeramos ácidos nucleicos e nucleotídeos na alimentação, a sobrevivência não requer sua absorção e utilização. Como os nucleotídeos estão envolvidos em muitos níveis do metabolismo, eles são alvos importantes para os agentes quimioterápicos usados no tratamento de infecções microbianas e parasitárias e câncer.

Este capítulo descreverá a estrutura e o metabolismo de duas classes de nucleotídeos: purínicos e pirimidínicos. As vias metabólicas são divididas em quatro seções:

- Síntese *de novo* de nucleotídeos de metabólitos básicos, a qual é necessária em células em divisão.
- Vias de recuperação, que reciclam bases e nucleosídios pré-formados e fornecem um suprimento adequado de nucleotídeos para células em repouso.
- Vias catabólicas para excreção de produtos de degradação de nucleotídeos, um processo que é essencial para limitar o acúmulo de níveis tóxicos de nucleotídeos no interior das células
- Vias biossintéticas de conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, fornecendo precursores do DNA.

Purinas e pirimidinas

Os nucleotídeos são formados por três componentes: uma base nitrogenada, um açúcar de cinco carbonos e fosfato. As bases nitrogenadas encontradas nos ácidos nucleicos pertencem a um de dois grupos heterocíclicos, purinas ou pirimidinas (Fig. 30.1). As principais purinas, tanto de DNA quanto de RNA, são guanina e adenina.

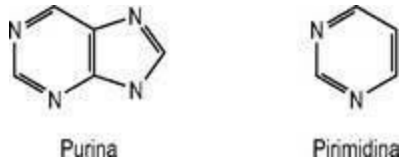
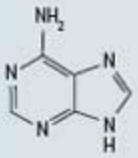
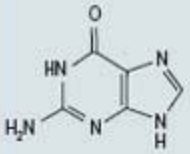
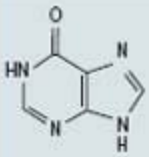
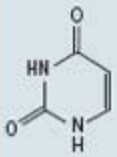
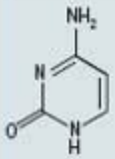
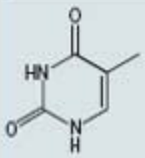


Fig. 30.1 Classificação de nucleotídeos. Estruturas básicas de purinas e pirimidinas.

No DNA, as principais pirimidinas são timina e citosina, enquanto no RNA são uracila e citosina: a timina é exclusiva de DNA e a uracila é exclusiva de RNA. Quando as bases nitrogenadas estão combinadas com um açúcar de cinco átomos de carbono, elas são conhecidas como nucleosídios. Quando os nucleosídios são fosforilados, os compostos são conhecidos como nucleotídeos. O fosfato pode estar ligado à posição 5′ ou à posição 3′ da ribose, ou ambas. A Tabela 30.1 dá os nomes e as estruturas das purinas e pirimidinas mais importantes.

Tabela 30.1 Nomes e estrutura de purinas e pirimidinas importantes.

Estrutura	Base livre	Nucleosídio	Nucleotídeo
	adenina	adenosina	AMP ADP ATP cAMP
	guanina	guanosina	GMP GDP GTP cGMP
	hipoxantina	inosina	IMP
	uracila	uridina	UMP UDP UTP
	citosina	citidina	CMP CDP CTP
	timina	timidina	TMP TDP TTP

METABOLISMO DAS PURINAS

Síntese de novo do anel purínico: síntese de monofosfato de inosina (IMP)

A demanda de biossíntese de nucleotídeos pode variar muito. Ela é alta durante a fase S do ciclo celular, quando as células estão por se dividir (Cap. 43). O processo é, portanto, muito ativo nos tecidos em crescimento, nas células ativamente proliferativas, como células sanguíneas e células cancerosas, e quando os tecidos estão se regenerando. As biossínteses de purina e pirimidina são processos com alto custo energético, que estão sujeitos aos mecanismos intracelulares que detectam e regulam eficazmente as quantidades das misturas de intermediários e produtos.

As matérias-primas para a síntese de purina são: CO_2, aminoácidos não essenciais (Asp, Glu, Gly), e derivativos de ácido fólico que atuam como doadores de um único átomo de carbono. Cinco moléculas de ATP são necessárias para a síntese de IMP, o primeiro produto de purina e precursor comum de AMP e GMP. O material inicial para a síntese de IMP é a ribose 5-fosfato, um produto da via de pentose fosfato (Cap. 12). A primeira etapa, catalisada pela ribose fosfato pirofosfoquinase (ou PRPP sintetase), gera a forma ativada da pentose fosfato pela transferência de um grupo pirofosfato do ATP para formar 5-fosforribosil-pirofosfato (PRPP) (Fig. 30.2). Em uma série de 10 reações, o PRPP é convertido em IMP. A maioria dos carbonos e todos os nitrogênios do anel de purina são de derivativos dos aminoácidos: um carbono é derivado de CO_2 e dois de N^{10}-formil-tetrahidrofolato (THF), um derivado do ácido fólico. A deficiência de folato pode comprometer a síntese de purinas, o que pode resultar em doença ou pode ser explorada clinicamente para matar células que se dividem rapidamente, as quais têm uma alta demanda da biossíntese de purinas. O produto final desta sequência de reações é o ribonucleotídeo IMP; o nucleosídio é inosina e a base purínica é chamada hipoxantina.

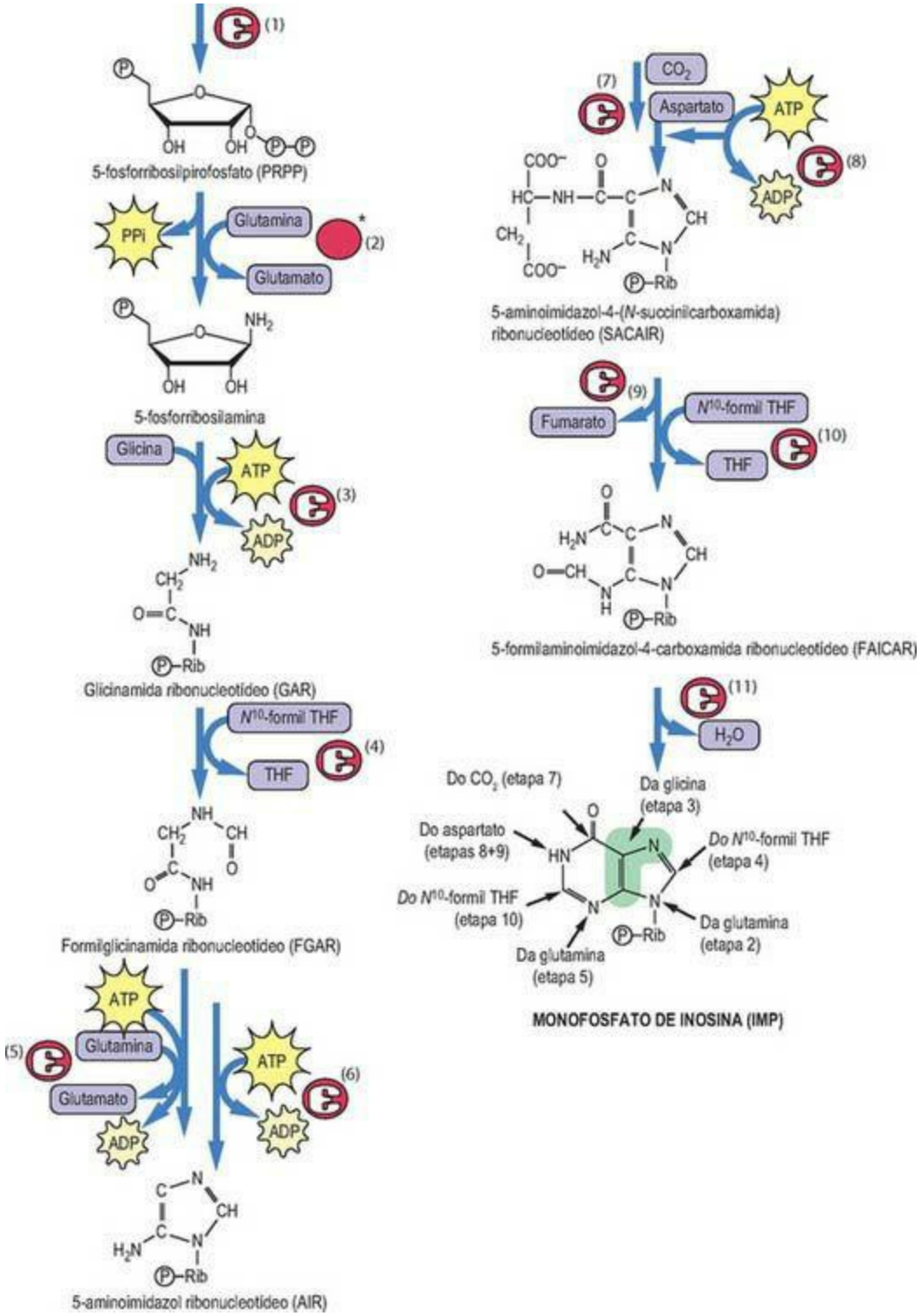


Fig. 30.2 Síntese de IMP. Enzimas para as etapas indicadas: (1) PRPP sintetase; (2) amidofosforribosil transferase; (3) GAR sintetase; (4) GAR transformilase; (5) FGAM sintetase; (6) AIR sintetase; (7) AIR carboxilase; (8) SACAIR sintetase; (9) adenilosuccinato liase; (10) AICAR transformilase; (11) IMP sintase. *O asterisco identifica a enzima reguladora amidofosforribosil transferase.

Síntese de ATP e GTP de IMP

O IMP não se acumula significativamente no interior da célula. Como mostrado na Figura 30.3, é convertido em AMP e GMP. Duas reações enzimáticas são necessárias em cada caso (Fig. 30.3). Enzimas diferentes, adenilato quinase e guanilato quinase, usam o ATP para sintetizar os nucleotídeos difosfatados de nucleotídeos monofosfatados. Finalmente, uma única enzima, denominada nucleotídeo difosfoquinase, converte difosfonucleotídeos em nucleotídeos trifosfatados. Esta enzima tem atividade em todos os nucleotídeos difosfatados, incluindo pirimidinas e purinas e tanto ribo como desoxirribonucleotídeos para as sínteses de RNA e DNA, respectivamente.

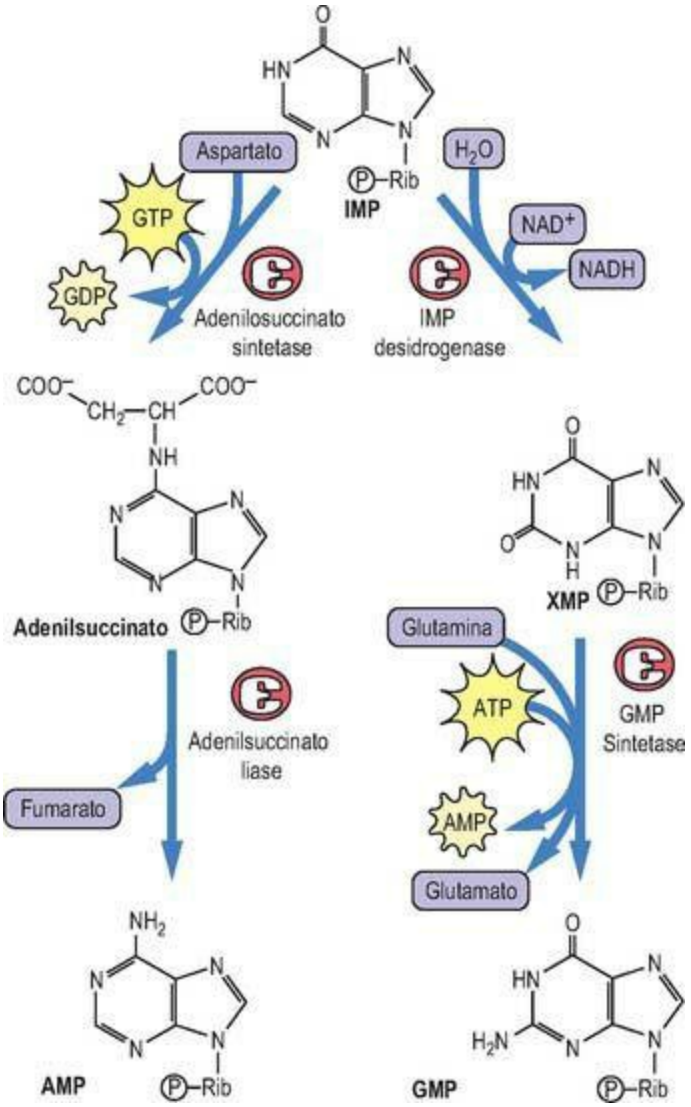


Fig. 30.3 Conversão de IMP em AMP e GMP. Duas reações enzimáticas são necessárias em cada ramificação da via. XMP, monofosfato de xantosina.

Nucleotídeos pré-formados podem ser reciclados por vias de recuperação

Além da síntese *de novo*, as células podem usar nucleotídeos pré-formados, obtidos da dieta ou da quebra de ácidos nucleicos endógenos, por meio de vias de recuperação. Em mamíferos, existem duas enzimas na via de recuperação de purina. A adenina fosforibosil transferase (APRT) converte a adenina livre em AMP (Fig. 30.4A). A hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HGPRT) catalisa uma reação similar para hipoxantina (a base purínica no IMP) e guanina (Fig. 30.4B). Os nucleotídeos purínicos são sintetizados preferencialmente por vias de recuperação, contanto que as bases livres estejam disponíveis. Esta preferência é mediada por inibição pela hipoxantina da amidofosforribosil transferase, etapa 2 da via *de novo*. Observe que esta etapa é o ponto de inibição da biossíntese de purina, uma vez que o PRPP é também usado em outros processos biossintéticos, incluindo vias de recuperação de nucleotídeos.

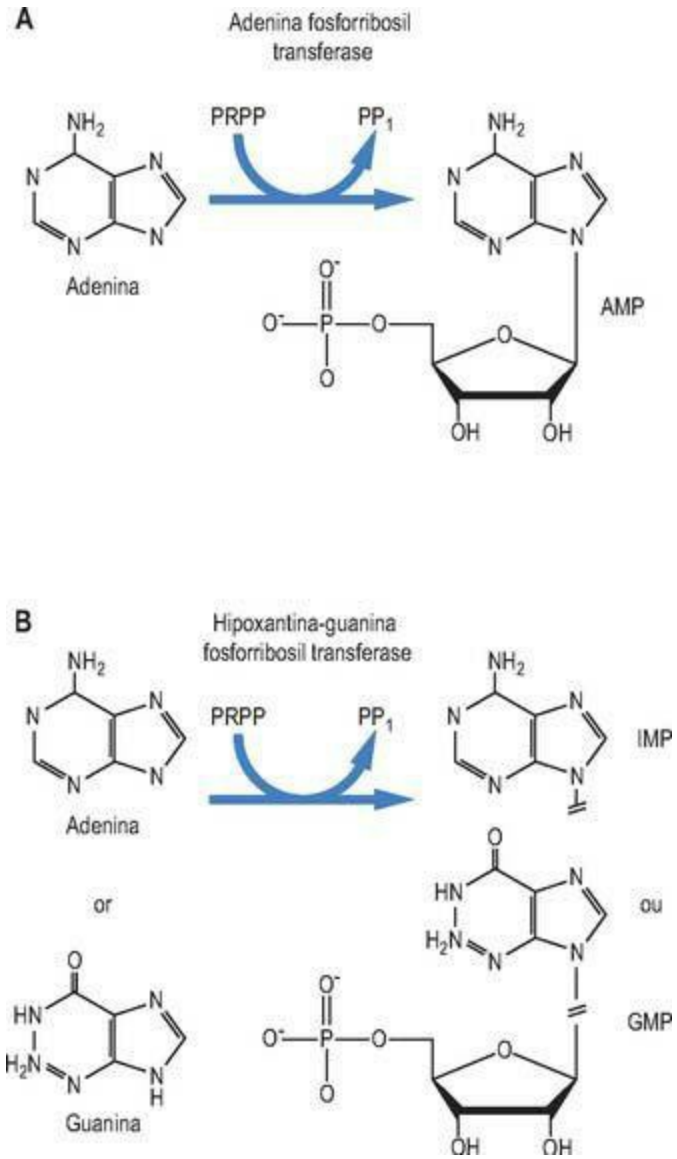


Fig. 30.4 As vias de recuperação de purina. (A) adenina fosforribosil transferase. (B) Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase.

Purinas e metabolismo de ácido úrico em humanos

Fontes e eliminação de ácido úrico

O ácido úrico é o produto final do catabolismo de purinas em humanos; não é metabolizado e deve ser excretado. Contudo, o processamento renal complexo do urato, descrito a seguir, sugere uma vantagem evolutiva para se ter altos níveis de urato circulante. De fato, o ácido úrico é um dos principais antioxidantes circulantes. Em pH 7,4, está 98% ionizado e, portanto, circula como urato monossódico. Este sal tem baixa solubilidade, o fluido extracelular se torna saturado em concentrações de urato um pouco acima do limite superior da faixa de referência normal. Portanto, existe uma tendência do urato monossódico a se cristalizar em indivíduos com hiperuricemia. A manifestação clínica mais óbvia deste processo é a gota, na qual se formam cristais nas cartilagens, membranas e líquidos sinoviais. Isto pode ser acompanhado por cálculo renal (pedras de urato) e "tofos" (acúmulo de urato de sódio em tecidos moles). Um aumento repentino da produção de urato, por exemplo, durante quimioterapia, quando muitas células morrem rapidamente, pode levar à cristalização dispersa de urato nas articulações, mas principalmente na urina, causando uma nefropatia de urato aguda.

Existem três fontes de purina no homem: síntese *de novo*, vias de recuperação e dieta. O conjunto total corporal de urato (portanto, a concentração plasmática de ácido úrico) é controlado pelas taxas relativas de formação e excreção de urato. Mais da metade do urato é eliminada pelos rins, e o restante pelos intestinos, onde bactérias se utilizam dele. Nos rins, o urato é filtrado e quase totalmente reabsorvido no túbulo proximal. Mais adiante, ocorrem secreção e absorção, de forma que a remoção global de urato totaliza cerca de 10% do total filtrado, isto é, 90% ficam retidos no organismo. Normalmente, a excreção de urato aumenta se a carga filtrada é aumentada. Devido à função do rim no metabolismo do urato, doenças renais podem levar à retenção de urato e precipitação de urato no rim (pedras) e urina. As purinas da dieta totalizam cerca de 20% do urato excretado. Portanto, a restrição de purinas na dieta (menos carne) pode reduzir os níveis de urato a somente 10%-20%.

AS VIAS DE RECUPERAÇãO SãO AS PRINCIPAIS FONTES DE NUCLEOTÍDEOS NOS LINFÓCITOS

Em humanos, linfócitos T em repouso, células do sistema imune produzidas no timo (Cap. 38), obtêm suas necessidades metabólicas de rotina de nucleotídeos por meio da via de recuperação, mas a síntese *de novo* é necessária para garantir o crescimento de células que se dividem rapidamente. A recuperação de nucleotídeos é especialmente importante nos linfócitos T infectados por HIV. Em pacientes assintomáticos, os linfócitos em repouso exibem um bloqueio da biossíntese *de novo* de pirimidina e quantidades de produtos de pirimidina correspondentemente reduzidas. Após a ativação da população dos linfócitos T, estas células não podem sintetizar DNA novo suficiente. O processo de ativação leva à morte celular, contribuindo para o declínio da população de linfócito T durante os estágios tardios da infecção por HIV.

As vias de recuperação também são especialmente importantes para muitos parasitas. Estes organismos dependem metabolicamente de seus hospedeiros, usando metabólitos pré-formados, incluindo nucleotídeos. Alguns parasitas, tais como *Mycoplasma, Borrelia e Chlamydia*, perderam os genes necessários para a síntese *de novo* de nucleotídeos, e obtêm estes componentes importantes do hospedeiro.

A GOTA É RESULTANTE DO EXCESSO DE ÁCIDO ÚRICO

Diagnóstico. O diagnóstico da gota é principalmente clínico e baseado na demonstração de hiperuricemia. Cerca de 90% dos pacientes parecem excretar urato a uma taxa inadequadamente baixa para a concentração plasmática, enquanto cerca de 10% apresentam produção excessiva. A artrite gotosa tem um início tipicamente hiperagudo (menos de 24 horas), com dor aguda, inchaço, vermelhidão e calor na(s) articulação(ões), especialmente no dedão do pé. É confirmada pela presença de "tofos" ou cristais de urato de sódio no líquido sinovial. Os cristais, em forma de agulha, são vistos no interior dos neutrófilos e têm birrefringência negativa quando vistos sob luz polarizada.

Patogênese. Os cristais de urato nas articulações são fagocitados pelos neutrófilos (leucócitos do sangue e dos tecidos). Os cristais danificam as membranas lisossomais e celulares, causando lise e morte celular. A liberação das enzimas lisossomais nas articulações desencadeia uma reação inflamatória aguda. Várias citocinas aumentam e perpetuam a inflamação e outras células fagocíticas, monócitos e macrófagos, agravam a inflamação.

Tratamento. A crise aguda é tratada com agentes anti-inflamatórios, incluindo drogas anti-inflamatórias não esteroides (NSAIDS). Mudanças na dieta (menos carne, aumento da ingestão de água, redução de peso) e mudanças nas terapias concomitantes com drogas, tais como diuréticos, podem ser úteis. A probenecida, uma droga uricosúrica, é comumente empregada para reduzir a uricemia. A colchicina, um desagregador de microtúbulos, pode também ser usada durante uma crise aguda para inibir a inflamação e a fagocitose. Se o paciente já é um hiperexcretor, ou "tofos" ou doença renal estão presentes, o alopurinol é, então, utilizado. Este é um inibidor de xantina oxidase (Fig. 30.5). O alopurinol sofre a primeira oxidação originando aloxantina, que não pode sofrer uma segunda oxidação. A aloxantina permanece ligada à enzima, atuando como um inibidor competitivo potente. Isso leva à formação reduzida de ácido úrico e ao acúmulo de xantina e hipoxantina, que são mais solúveis e excretadas na urina.

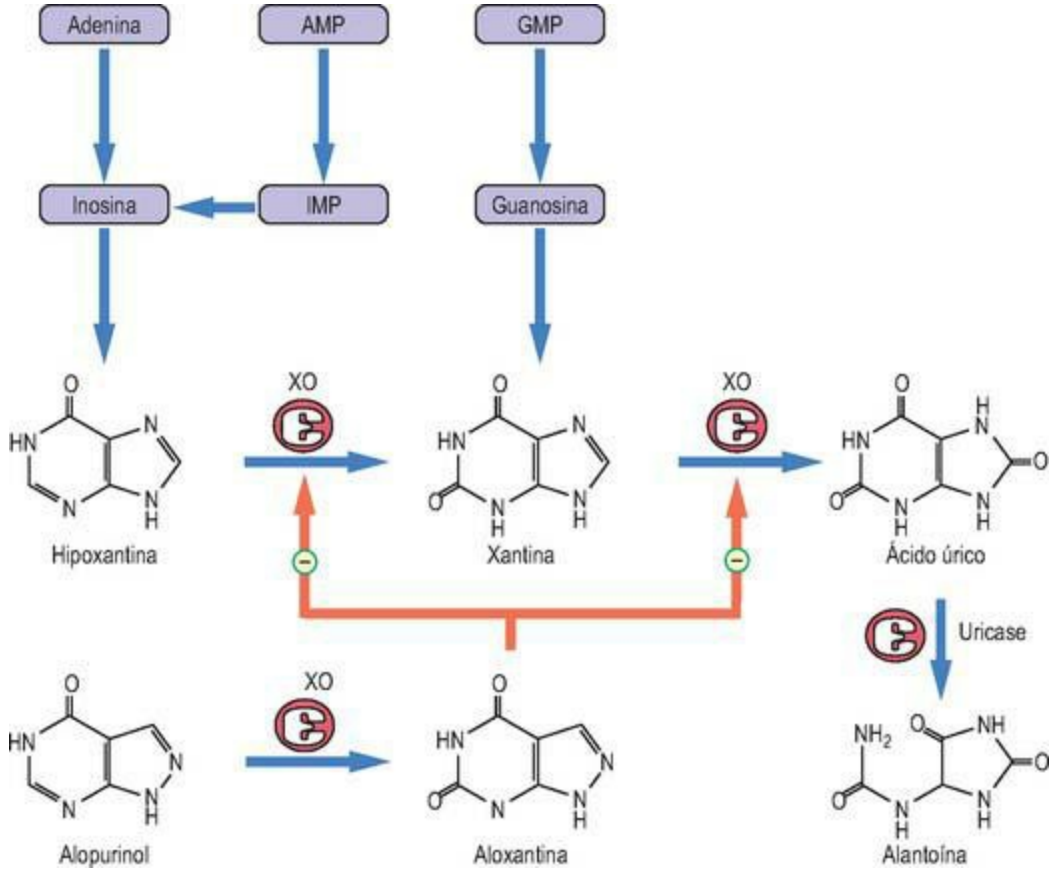


Fig. 30.5 Degradação de purinas e base bioquímica do tratamento de gota com alopurinol. A inibição da xantina oxidase (XO) por aloxantina é o mecanismo envolvido no tratamento de gota com alopurinol. A enzima uricase não existe em primatas (incluindo o homem), mas é comumente usada para a dosagem de níveis séricos de ácido úrico em seres humanos.

Formação endógena de ácido úrico

Cada um dos monofosfatos de purina (IMP, GMP e AMP) pode ser convertido em seus nucleosídios correspondentes pela 5′-nucleotidase. A enzima purina nucleosídio fosforilase converte, então, os nucleosídios inosina ou guanosina nas bases purínicas livres hipoxantina e guanina, respectivamente. A hipoxantina é oxidada e a guanina é desaminada para gerar xantina (Fig. 30.5). Duas outras enzimas, AMP desaminase e adenosina desaminase, convertem o grupo amino do AMP e da adenosina em IMP e inosina, respectivamente, que são convertidos, então, em hipoxantina. Em resumo, a guanina é convertida diretamente em xantina, enquanto a inosina e a adenina são convertidas em hipoxantina e, então, em xantina.

A xantina oxidase (XO), a enzima final desta via, oxida hipoxantina em xantina e, então, xantina em ácido úrico. O ácido úrico é o produto metabólico final do catabolismo de purina em primatas, pássaros, répteis e muitos insetos. Outros organismos, incluindo a maioria dos mamíferos, peixes, anfíbios e invertebrados, metabolizam ácido úrico a produtos mais solúveis, tais como alantoína (Fig. 30.5).

Hiperuricemia e gota

A concentração plasmática de urato é, em média, mais alta em homens do que em mulheres, tende a aumentar com a idade e é geralmente elevada em indivíduos obesos e em indivíduos de classes socioeconômicas mais altas. O risco de gota, uma doença dolorosa resultante da precipitação de cristais de urato de sódio nas articulações e na derme, aumenta com maiores concentrações plasmáticas de urato (quadro da pág. 408). A maioria das pessoas com hiperuricemia permanece assintomática por toda a vida, mas não existe gota sem hiperuricemia. Esta pode ser devida à formação aumentada ou à excreção diminuída de ácido úrico, ou ambas. A excreção renal diminuída de urato pode resultar de uma redução na filtração e/ou secreção. Muitos fatores (incluindo drogas e álcool) também afetam o processamento tubular de uratos e podem causar ou aumentar a hiperuricemia.

METABOLISMO DAS PIRIMIDINAS

Como ocorre com as purinas, as pirimidinas (uracil, citosina e timina) também são sintetizadas por meio de uma série complexa de reações usando matéria-prima comum disponível nas células. Uma diferença importante é que a base pirimidina é feita primeiro e o açúcar é adicionado depois. O monofosfato de uridina (UMP) é o precursor de todos os nucleotídeos pirimidínicos. A via *de novo* produz UMP, que é, então, convertido em trifosfato de citidina (CTP) e trifosfato de timidina (TTP). As vias de recuperação também usam pirimidinas pré-formadas.



SÍNDROME DE LESCH-NYHAN – DEFICIÊNCIA DE HGPRT

O gene que codifica HGPRT está localizado no cromossomo X. Sua deficiência resulta em uma doença rara, recessiva, ligada ao X, a síndrome de Lesch-Nyhan. A ausência de HGPRT funcional causa um acúmulo excessivo de PRPP, que é também substrato para a enzima amidofosforribosil transferase. Isto estimula a biossíntese de purina em até 200 vezes. Por causa da síntese aumentada de purina, o produto de degradação, o ácido úrico, também se acumula em altos níveis. O ácido úrico elevado leva à artrite gotosa deformante e neuropatologia grave, resultando em retardo mental, espasmos, comportamento agressivo e compulsão à automutilação resultante de mordidas e arranhões.

Via *de novo*

As biossínteses de pirimidina e purina compartilham vários precursores comuns: CO_2, aminoácidos (Asp, Gln) e, para timina, N^5,N^{10}-metileno-THF. A via de biossíntese de UMP está esquematizada na Figura 30.6. A primeira etapa, catalisada pela enzima carbamoil fosfato sintetase II (CPS II), usa bicarbonato, glutamina e 2 moles de ATP para formar carbamoil fosfato (a CPS I é usada na síntese de arginina no ciclo da ureia; Cap. 19). A maioria dos átomos necessários para a formação do anel de pirimidina é derivada de aspartato, adicionados em uma única etapa pela aspartato transcarbamoilase (ATCase). O carbamoil aspartato é, então, ciclizado em ácido di-hidroorótico pela ação da enzima di-hidroorotase. O ácido di-hidroorótico é oxidado em ácido orótico por uma enzima mitocondrial, di-hidroorotato desidrogenase. A leflunomida, um inibidor específico desta enzima, é usada para o tratamento de artrite reumatoide porque o bloqueio desta etapa inibe a ativação do linfócito e, portanto, limita a inflamação. O grupo ribosil-5′-fosfato do PRPP é, então, transferido para o ácido orótico para formar o monofosfato de orotidina (OMP). Finalmente o OMP é descarboxilado para formar UMP. O UTP é sintetizado em duas etapas de fosforilação enzimática pela ação de UMP quinase e nucleotídeo difosfoquinase. A CTP sintetase converte UTP em CTP pela aminação de UTP. Isto completa a síntese de ribonucleotídeos para a síntese de RNA.

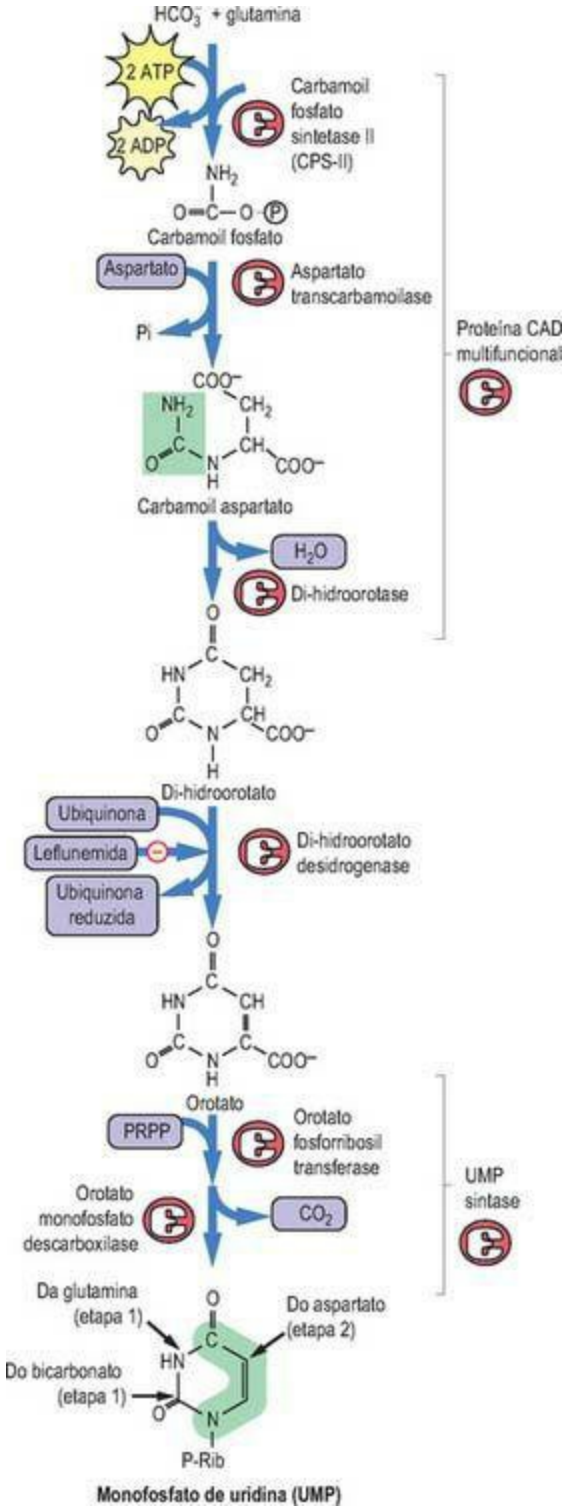


Fig. 30.6 A via metabólica de síntese de pirimidinas. Formação de ácido orótico e UMP, o primeiro nucleotídeo pirimidínico.

A canalização metabólica por multienzimas aumenta a eficiência

Em bactérias, as seis enzimas da biossíntese de pirimidina (UMP) existem como proteínas distintas. Entretanto, durante a evolução dos mamíferos, as três primeiras atividades enzimáticas foram fusionadas em CAD, um polipeptídio multifuncional único codificado por um único gene. O nome da enzima deriva de suas três atividades: **C**arbamoil fosfato sintetase, **A**spartato transcarbamoilase e **D**i-hidroorotase. As duas atividades enzimáticas finais da biossíntese de pirimidina, orotato fosforribosil transferase e orotidilato descarboxilase, são também fusionadas em uma única enzima,

UMP sintase. Como ocorre com o complexo de ácido graxo sintase (Cap. 16), esta fusão de atividades enzimáticas sequenciais evita a difusão de intermediários metabólicos no meio intracelular, aumentando, portanto, a eficiência metabólica das etapas individuais.

Vias de recuperação de pirimidina

Como ocorre para as purinas, as bases livres de pirimidina, disponíveis com a dieta ou com a degradação de ácidos nucleicos, podem ser recuperadas por várias enzimas de recuperação. A uracil fosforribosil transferase (UPRTase) é similar à s enzimas das vias de recuperação de purina. Esta enzima é necessária para ativar alguns agentes quimioterápicos, tais como 5-fluorouracil (FU) ou 5-fluorocitosina (FC). Uma uridina-citidina quinase e uma timidina quinase mais específica catalisam a fosforilação desses nucleosídios; nucleotídeos quinases e difosfoquinase completam o processo de recuperação.

FORMAÇãO DE DESOXINUCLEOTÍDEOS

A ribonucleotídeo redutase

Como o DNA tem dexorribonucleotídeos em lugar dos ribonucleotídeos encontrados no RNA, as células necessitam de vias para converter ribonucleotídeos em formas desoxi. Os desoxirribonucleotídeos de adenina, guanina e uracil são sintetizados de seus correspondentes ribonucleotídeo difosfatados por redução direta da 2′-hidroxila pela enzima ribonucleotídeo redutase, como mostrado para dUDP na Figura 30.7. A redução da 2′-hidroxila da ribose usa um par de grupos sulfidrilas ligados à proteína (resíduos de cisteína). O grupo hidroxila é liberado como água, e as cisteínas são oxidadas em cistina durante a reação. Para regenerar uma enzima ativa, o dissulfeto deve ser reduzido de volta ao par de sulfidrilas original por troca de dissulfeto; isto é realizado pela reação com uma proteína pequena, tiorredoxina. A tiorredoxina, uma proteína Fe-S altamente conservada, é, por sua vez, reduzida pela flavoproteína tiorredoxina redutase.

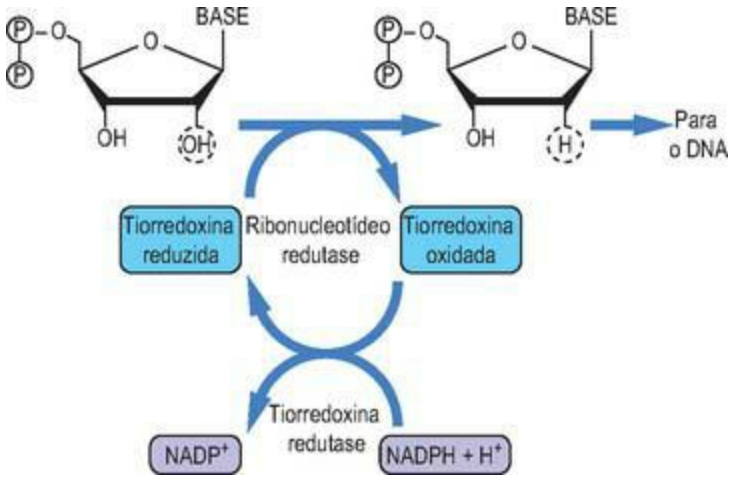


Fig. 30.7 Formação de desoxirribonucleotídeos, exceto TTP, por ribonucleotídeo redutase. Tiorredoxina e NADPH (da via de pentose fosfato) são necessários para a reciclagem da enzima.

Uma via única para TTP

O nucleotídeo desoxi-TMP, abreviado como TMP, único para o DNA, é sintetizado por uma via especial envolvendo metilação da forma desoxirribose do uridilato, dUMP (Fig. 30.8). A via biossintética de TMP leva o UMP a UDP, então, através da ribonucleotídeo redutase, a dUDP. O dUDP é, então, fosforilado a dUTP, o que cria um problema bioquímico inesperado. A DNA polimerase não discrimina eficientemente entre os dois desoxirribonucleotídeos, dUTP e TTP – a única diferença é um grupo metil no *C*-5. Ela incorpora dUTP no DNA *in vitro*; esta reação levaria a altas taxas de mutagênese *in vivo*. Portanto, as células limitam a concentração de dUTP por hidrolisar rapidamente dUTP em dUMP com a enzima dUTPase. Esta enzima cliva uma ligação de alta energia e libera pirofosfato, que é rapidamente hidrolizado em fosfato, deslocando o equilíbrio sempre em direção à formação de dUMP. O dUMP é convertido em TMP usando N^5, N^{10}-metileno-THF como doador de metil; o produto di-hidrofolato é reciclado pela ação das enzimas, di-hidrofolato redutase e serina hidroximetil transferase. Duas etapas de fosforilação de TMP originam o TTP para a síntese de DNA.

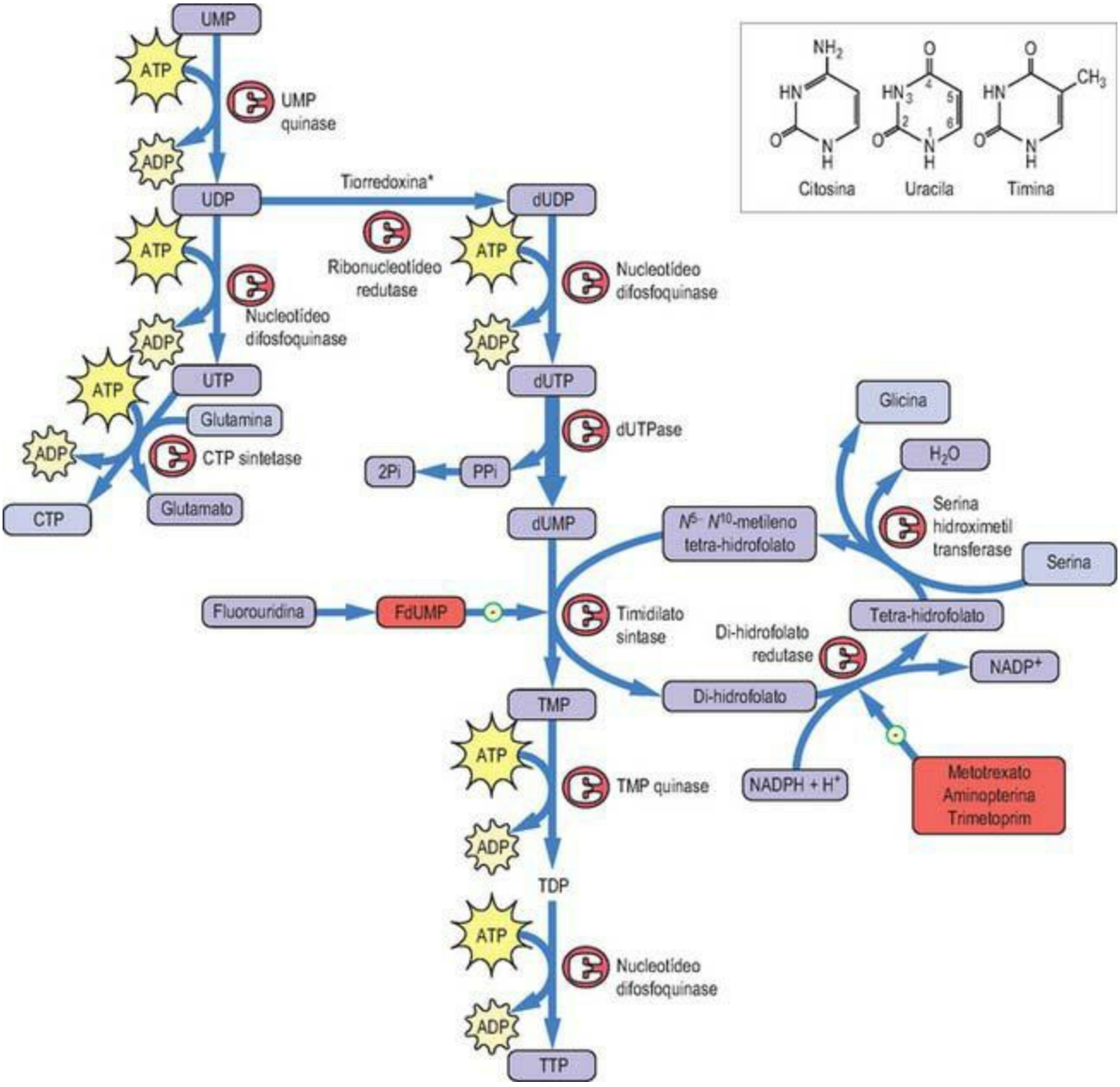


Fig. 30.8 Síntese de trifosfatos de pirimidina. A síntese de timidina é inibida por fluorodesoxiuridilato (FdUMP), metotrexato, aminopterina e trimetoprim nos pontos indicados. *A tiorredoxina restaura os resíduos sulfidrila da ribonucleotídeo redutase, regenerando a enzima ativa (Fig. 30.7).

A síntese de TTP é uma via improdutiva, mas oferece oportunidade de quimioterapia pela inibição da biossíntese de TMP (Fig. 30.8). Existe uma reação na síntese de pirimidina que requer um derivativo de THF: conversão de dUMP em TMP, catalisada pela timidilato sintase. Esta reação tem frequentemente uma velocidade limitante para a divisão celular. De fato, a deficiência de folato compromete a replicação celular, especialmente a replicação de células que se dividem rapidamente. Portanto, a deficiência de folato é uma causa frequente de anemia: as células da medula óssea envolvidas na eritropoese e hematopoese estão entre as células que se dividem mais rapidamente no corpo. A inibição de timidilato sintase, diretamente ou pela inibição da reciclagem de THF, oferece a oportunidade especial de quimioterapia direcionada para a síntese de precursores de DNA em células cancerosas que se dividem rapidamente.

ALVOS QUIMIOTERAPÊUTICOS: RECICLAGEM DE FOLATO E TIMIDILATO

SINTASE

O fluorodesoxiuridilato (FdUMP) é um inibidor suicida específico de timidilato sintase. No FdUMP, um fluoreto altamente eletronegativo substitui o próton do carbono-5 da uridina. Este composto pode iniciar a conversão enzimática em dTMP por formar o complexo covalente enzima-FdUMP; contudo, o intermediário covalente não pode aceitar o grupo metil doado pelo metileno THF, nem pode ser quebrado para liberar a enzima ativa. O resultado é um complexo suicida, no qual o substrato fica covalentemente ligado no sítio ativo da timidilato sintase. A droga é frequentemente administrada como fluorouridina, e o metabolismo normal do corpo converte a fluorouridina em FdUMP. A fluorouridina é usada contra cânceres de mama, colorretal, gástrico e uterino.

A fluorocitosina é um agente antimicrobiano potente. Seu mecanismo de ação é similar ao do FdUMP; entretanto, ela deve ser inicialmente convertida em fluorouracila pela ação da citosina desaminase. A fluorouracila é subsequentemente convertida em FdUMP, que bloqueia a timidilato sintase, como descrito. Enquanto a citosina desaminase está presente na maioria dos fungos e bactérias, está ausente em animais e plantas. Portanto, em humanos, a fluorocitosina não é convertida em fluorouracila e não é tóxica, enquanto nos micróbios, o metabolismo da fluorocitosina resulta em morte celular.

A aminopterina e o metotrexato são análogos do ácido fólico que se ligam cerca de 1.000 vezes mais fortemente à di-hidrofolato redutase (DHFR) do que o di-hidrofolato. Dessa forma, eles bloqueiam competitiva e quase irreversivelmente a síntese de dTMP. Estes compostos são também inibidores competitivos de outras reações enzimáticas dependentes de THF usadas na biossíntese de purinas, histidina e metionina. A trimetoprima se liga à DHFR, e se liga mais fortemente a DHFRs bacterianas do que à s enzimas de mamíferos, o que a torna um agente antibacteriano eficaz. Os análogos de folato são agentes quimioterápicos relativamente não específicos. Eles envenenam as células que se dividem, não apenas as células cancerosas, mas também folículos capilares e endotélio intestinal, causando perda de cabelo e efeitos colaterais gastrointestinais da quimioterapia.

O metabolismo *de novo* de nucleotídeos é altamente regulado

Como os nucleotídeos são necessários para a proliferação das células de mamíferos, as enzimas envolvidas na síntese *de novo* de ambas purinas e pirimidinas são induzidas durante a fase S da divisão celular. Regulações covalente e alostérica também desempenham um papel importante no controle da síntese de nucleotídeos. A proteína multimérica CAD é ativada por fosforilação por proteína quinase em resposta a fatores de crescimento, aumentando sua afinidade por PRPP e diminuindo a inibição por UTP. Ambas as mudanças favorecem a biossíntese de pirimidinas para a divisão celular.

Mol por mol, a biossíntese de pirimidina se compara à biossíntese de purina, sugerindo a presença de um controle coordenado. Entre elas, um dos pontos-chave é a reação da PRPP sintase. O PRPP é um precursor para todos os ribo e desoxirribonucleotídeos. A PRPP sintase é inibida tanto por nucleotídeos pirimidínicos como purínicos.

A ribonucleotídeo redutase coordena a biossíntese de todos os quatro desoxirribonucleotídeos

Como uma única enzima é responsável pela conversão de todos os ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, esta enzima está sujeita a uma rede complexa de regulação por retroalimentação. A ribonucleotídeo redutase contém vários sítios alostéricos para a regulação metabólica. Os níveis de cada um dos dNTPs modulam a atividade da enzima frente a outros NDPs. Por regular a atividade enzimática da síntese de desoxirribonucleotídeos em função da concentração dos diferentes dNTPs, frequentemente descrita como “conversa” entre as vias, a célula garante que razões adequadas dos diferentes desoxirribonucleotídeos sejam produzidas para o crescimento normal e a divisão celular.

Catabolismo de nucleotídeos pirimidínicos

Ao contrário da degradação de purinas a ácido úrico, as pirimidinas são degradadas em compostos solúveis, que são rapidamente eliminados na urina e não são fonte frequente de patologia. Os nucleotídeos e nucleosídios de pirimidina são convertidos em bases livres e o anel heterocíclico é clivado, originando β-aminoisobutirato, como produto principal de excreção, mais alguma amônia e CO_2.

Resumo

Os nucleotídeos são sintetizados principalmente de precursores de aminoácidos e fosforribosilpirofosfato por vias complexas, com múltiplas etapas e metabolicamente caras. Sem surpresa, as vias de recuperação desempenham um papel importante no metabolismo de nucleotídeos. O metabolismo de nucleotídeo *de novo* é necessário para a proliferação celular. Ambas as classes de nucleotídeos (purinas e pirimidinas) são sintetizadas como precursores (IMP, UMP), que são, então, convertidos em precursores de DNA (dATP, dGTP, dCTP, TTP). Com exceção do TTP, os ribonucleotídeos são convertidos em desoxirribonucleotídeos pela ribonucleotídeo redutase. O TTP é sintetizado de dUMP por uma via especial envolvendo folatos. As vias de recuperação têm se mostrado úteis para a ativação de agentes farmacêuticos, enquanto a exclusividade da via de síntese de TTP tem fornecido um alvo especial para inibição quimioterapêutica da síntese de DNA e divisão celular em células cancerosas. O ácido úrico, o produto final do catabolismo de purina no homem, produz uma fonte de patologia: gota e cálculo renal.

AS SÍNDROMES DE IMUNODEFICIÊNCIAS COMBINADAS GRAVES (SCIDS) SãO CAUSADAS POR COMPROMETIMENTO DAS VIAS DE RECUPERAÇãO DE PURINAS

SCIDS são um grupo de desordens fatais resultantes de defeitos em ambas as funções celular e imune humoral. Os pacientes com SCIDS não podem produzir eficientemente anticorpos em resposta a um desafio antigênico. Quase 50% dos pacientes com a forma autossômica recessiva de SCIDS têm uma deficiência genética na enzima de recuperação de purina, adenosina desaminase. A fisiopatologia envolve linfócitos de ambas as origens do timo e da medula óssea (linfócitos T e B), como também "autodestruição" de células diferenciadas após estímulo antigênico. A causa precisa de morte celular não é bem conhecida, mas pode envolver acúmulo nos tecidos linfoides de adenosina, desoxiadenosina e dATP, acompanhado por depleção de ATP. O dATP inibe a ribonucleotídeo redutase e, portanto, impede a síntese de nucleotídeos de DNA. A descoberta de que deficiência da próxima enzima na via de recuperação de purinas, nucleosídio fosforilase, está também associada a desordens de deficiência imunológica sugere que a integridade da via de recuperação de purinas é crítica para a diferenciação normal e função de células imunocompetentes no homem.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Comparar as funções da síntese *de novo* e das vias de recuperação da síntese de nucleotídeos em vários tipos celulares, por exemplo, eritrócitos, linfócitos, músculo e fígado.

2. Além de sua atividade como um inibidor de xantina oxidase, que outras atividades do alopurinol podem contribuir para sua eficácia no tratamento da gota?

3. Discutir o uso de inibidores de timidilato sintetase e análogos de folato para o tratamento de outras doenças além do câncer (p. ex., artrite, psoríase).

Leituras sugeridas

Gangjee A, Jain HD, Kurup S. Recent advances in classical and non-classical antifolates as antitumor and antiopportunistic infection agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2008;8:205-231.

Nyhan WL. The recognition of Lesch–Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. *J Inherited Metab Dis*. 1997;20:171-178.

Sigoillot FD, Berkowski JA, Sigoillot SM, Kotsis DH, Guy HI. Cell cycle-dependent regulation of pyrimidine biosynthesis. *J Biol Chem.* 2003;278:3403-3409.

Terkeltaub R. Gout in 2006: the perfect storm. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2006;64:82-86.

Underwood M. Diagnosis and management of gout. *BMJ*. 2006;332:1315-1319.

Sites

Desordens ligadas Desordens ligadas a purinas e pirimidinas. http://www.lib.uiowa.edu/hardin/md/gout.html#pics.

Gota Gota:

- www.nlm.nih.gov/medlineplus/goutandpseudogout.html
- www.niams.nih.gov/hi/topics/gout/gout.htm; www.nhsdirect.nhs.uk/en.asp?TopicID=221
- www.emedicine.com/neuro/topic630.htm

SCIDS SCIDS. www.scid.net.

Ácido Desoxirribonucleico

R. Thornburg

A. Gugliucci

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a composição e a estrutura do DNA baseada no modelo de Watson-Crick, incluindo os conceitos de direcionalidade e complementaridade na estrutura do DNA.
- Descrever o processo de empacotamento do DNA no núcleo.
- Explicar como a replicação do DNA é realizada com alta fidelidade.
- Discutir as enzimas envolvidas, as atividades nas forquilhas de replicação e as estruturas e os intermediários que participam do processo de replicação.
- Descrever o mecanismo pelo qual a replicação é controlada na célula eucariótica.
- Descrever os tipos de danos ao DNA e os mecanismos envolvidos no reparo desta molécula.
- Descrever o mecanismo de ação do AZT para o tratamento da AIDS.

INTRODUÇãO

Os ácidos nucleicos celulares existem sob duas formas, ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). Aproximadamente 90% dos ácidos nucleicos presentes nas células encontram-se sob a forma de RNA e o restante é DNA. O DNA é o reservatório da informação genética. Este capítulo trata da estrutura do DNA, da maneira pela qual ele está armazenado nos cromossomos dentro do núcleo, e dos mecanismos envolvidos na sua biossíntese e no seu reparo.

ESTRUTURA DO ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

O DNA é um dímero antiparalelo de fitas de ácidos nucleicos. É composto por nucleotídeos contendo o açúcar desoxirribose. A desoxirribose não contém o grupamento hidroxila na posição 2′. As cadeias de DNA são polimerizadas por meio de ligações fosfodiéster entre o grupamento 3′-hidroxila de uma subunidade e o grupamento 5′-fosfato da subunidade seguinte (Fig. 31.1A). Portanto, o DNA é uma cadeia de desoxirribose 3′-5′ fosfato linear com bases de purinas e pirimidinas ligadas ao carbono 1′ da subunidade desoxirribose.

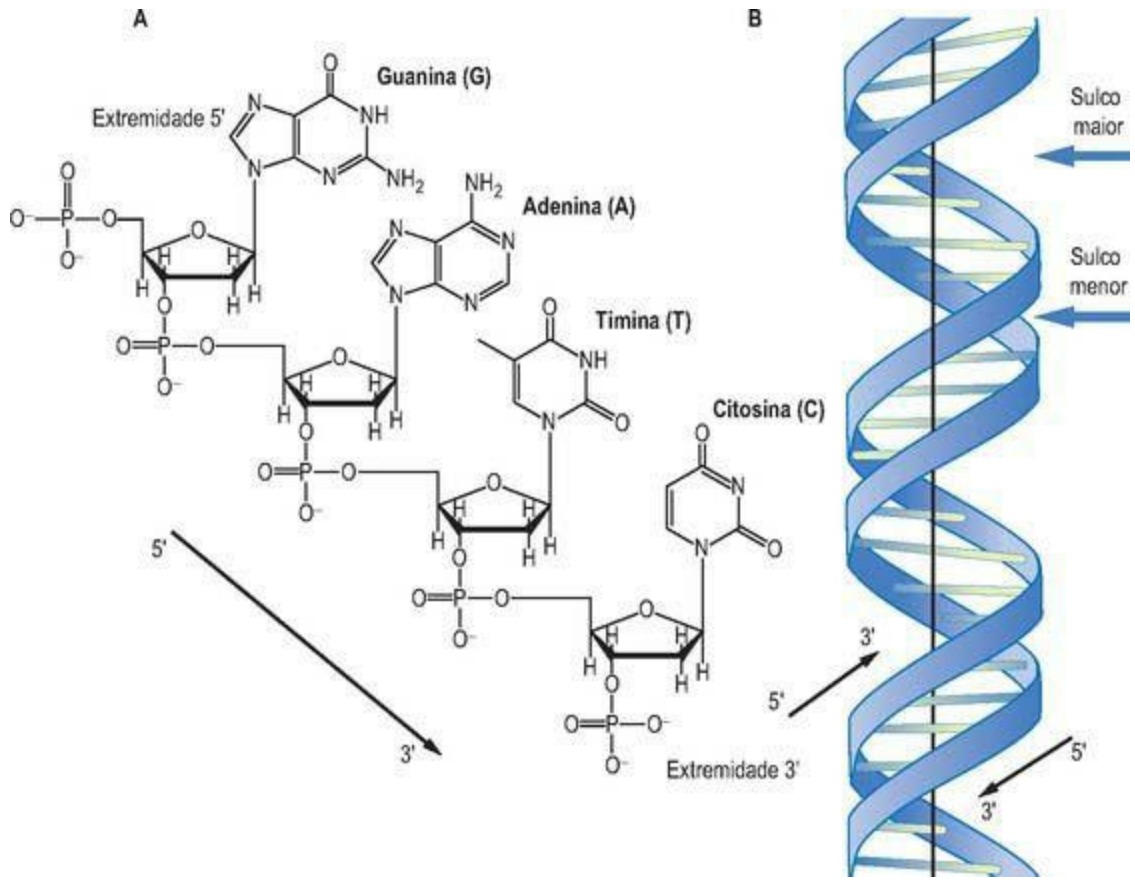


Fig. 31.1 Estrutura do DNA. (A) Uma sequência de tetranucleotídeos de DNA mostrando cada um dos nucleotídeos normalmente encontrados nesta molécula. Os açúcares desoxirribose não apresentam a 2′-hidroxila que está presente nos açúcares ribose encontrados no RNA. Por convenção, o DNA é lido da extremidade 5′ para a extremidade 3′, dessa forma a sequência deste tetranucleotídeo é 5′-GATC-3′. (B) Uma representação gráfica da estrutura do B-DNA, a principal forma de DNA na célula. Os pares de bases no centro são alinhados quase que perpendicularmente ao eixo helicoidal. O sulco maior e o sulco menor são mostrados. Observe que as fitas são antiparalelas.

Utilizando fotografias de difração de raios X do DNA, tiradas por Rosalind Franklin, James Watson e Francis Crick propuseram, em 1953, a estrutura do DNA. Esse modelo propôs que o DNA era composto por duas fitas complementares emparelhadas entre si e mantidas juntas por pontes de hidrogênio (Fig. 31.1B). A simplicidade básica dessa estrutura foi responsável por sua rápida aceitação. Enquanto alguns dos detalhes do modelo foram modificados, seus elementos essenciais permaneceram inalterados desde a sua proposta original.

O modelo de DNA de Watson e Crick

Conforme originalmente apresentado por Watson e Crick, o DNA é composto por duas fitas

enoveladas uma na outra em uma estrutura helicoidal dextrógira (voltas em sentido horário), com os pares de bases no centro e as cadeias de desoxirribosil fosfato na parte externa. A orientação das fitas de DNA é antiparalela, ou seja, as fitas se posicionam em direções opostas. As bases dos nucleotídeos de cada uma das fitas interagem com as bases de nucleotídeos da outra fita para formar os pares de bases (Fig. 31.2). Estes são planos e orientados quase que perpendicularmente ao eixo da hélice. Cada par de bases é formado por pontes de hidrogênio entre uma purina e uma pirimidina. A guanina forma três pontes de hidrogênio com a citosina, e a adenina forma duas pontes de hidrogênio com a timina. Por causa da especificidade dessa interação entre purinas e pirimidinas nas fitas opostas, diz-se que estas fitas de DNA possuem estruturas complementares. A força resultante das numerosas pontes de hidrogênio formadas entre as bases das fitas opostas e as interações hidrofóbicas entre essas bases são responsáveis pela extrema estabilidade da dupla hélice de DNA. Enquanto as pontes de hidrogênio entre as fitas são afetadas por temperatura e força iônica, estruturas complementares estáveis podem ser formadas em temperatura ambiente com apenas seis a oito nucleotídeos.

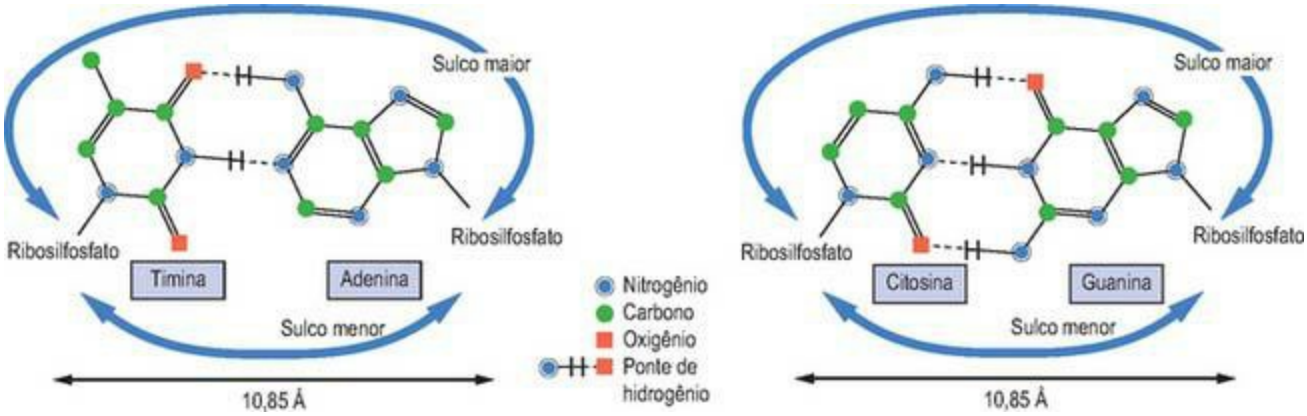


Fig. 31.2 Modelo Watson-Crick do pareamento de nucleotídeos no DNA. Os pares de bases AT formam duas pontes de hidrogênio e os pares de bases CG formam três pontes de hidrogênio. Portanto, regiões ricas em CG são mais estáveis do que as regiões ricas em AT.

O DNA tridimensional

A estrutura tridimensional do DNA dupla hélice é de tal forma que os esqueletos de desoxirribosil fosfato das duas fitas são ligeiramente deslocados do centro da hélice. Por causa disso, os sulcos entre as duas fitas possuem tamanhos diferentes. Estes sulcos são denominados sulco maior e sulco menor (Figs. 31.1B e 31.2). O sulco maior é mais aberto e expõe os pares de bases dos nucleotídeos. O sulco menor é mais apertado, sendo parcialmente bloqueado pelo conteúdo de desoxirribosil que liga os pares de bases. A ligação de proteínas ao DNA ocorre frequentemente no sulco maior e é específica para a sequência de nucleotídeos do DNA.

Formas alternativas do DNA podem auxiliar a regular a expressão gênica

Embora a maior parte das moléculas de DNA em uma célula exista sob a forma B descrita, formas alternativas de DNA também existem. Quando a umidade relativa da forma B cai a menos de 75%, esta forma sofre uma transição reversível para a forma A do DNA. Na forma A, os pares de bases dos nucleotídeos se apresentam inclinados 20° em relação ao eixo helicoidal e o diâmetro da hélice é maior quando comparado ao da forma B (Fig. 31.3). Quando as fitas de DNA consistem em sequências de polipurinas e de polipirimidinas, a hélice do DNA apresenta propriedades diferentes. Regiões de polipurinas são do tipo A, enquanto regiões de polipirimidinas são do tipo B. Essas regiões não se ligam eficientemente a histonas e são, portanto, incapazes de formar nucleossomos (ver adiante), resultando em regiões do DNA livre de nucleossomos (expostas).

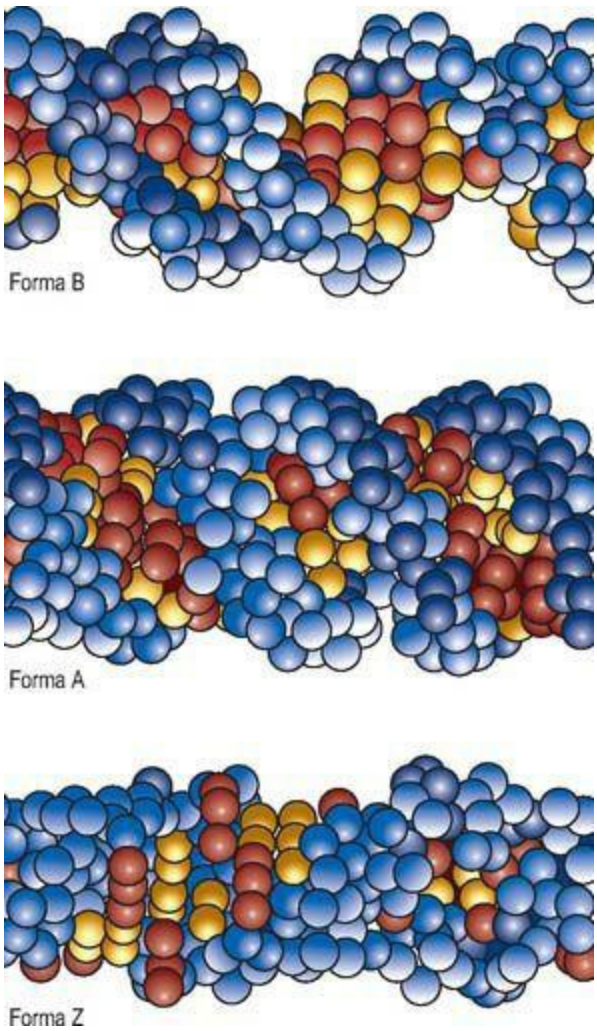


Fig. 31.3 As estruturas de diferentes formas do DNA, incluindo as formas B, A e Z. O esqueleto de açúcar-fosfato das fitas do DNA está representado em azul. As bases de nucleotídeos que formam os pares de bases internos estão representadas em amarelo, no caso das pirimidinas (timina e citosina), e em vermelho, no caso das purinas (adenina e guanina).

Outra forma única de DNA existe quando a sequência de nucleotídeos consiste em expansões alternadas de purina/pirimidina. Esta forma, denominada Z-DNA, é também favorecida em altas concentrações iônicas. No Z-DNA, os pares de bases giram 180° em relação à ligação ao açúcar do nucleotídeo. Isto resulta em uma nova conformação dos pares de bases em relação aos esqueletos de

açúcar-fosfato, gerando uma forma de DNA com uma configuração em zigue-zague (daí o nome Z-DNA) ao longo do esqueleto de açúcar-fosfato. Surpreendentemente, esta mudança conformacional leva à formação de uma hélice de DNA voltada para a esquerda. Embora a forma Z-DNA seja favorecida em altas concentrações iônicas, ela também pode ser induzida em concentrações iônicas normais pela metilação do DNA. As interações de ligação com proteínas a essas formas alternativas de DNA, que são amplamente distribuídas no genoma, estão envolvidas na regulação da expressão gênica.

Fitas de DNA separadas podem se reassociar para formar o DNA dúplex

Como as fitas de DNA são complementares e mantidas juntas somente por forças não covalentes, elas podem ser separadas nas fitas individuais. Essa separação das fitas, ou desnaturação do DNA, é comumente induzida pelo aquecimento da solução. A dissociação é reversível, e em condições de resfriamento as interações entre as sequências de nucleotídeos complementares se reassociam ou reanelam para formar novamente seus pares de bases originais. Esta é a base de um dos principais métodos de análise do DNA, a hibridização por *Southern* (Cap. 35). Como adenina e timina interagem por meio de duas pontes de hidrogênio e guanina e citosina por meio de três (Fig. 31.2), as regiões do DNA ricas em AT se dissociam em temperaturas mais baixas do que as regiões ricas em CG. A desnaturação do DNA pode também ser induzida localmente por enzimas ou proteínas que se ligam ao DNA. A região promotora do DNA consiste em uma sequência TATA (quadro TATA; Fig. 34.1), uma região do DNA facilmente dissociada que facilita o desenovelamento do DNA durante os estágios iniciais da expressão gênica (Cap. 34).

O genoma humano

O genoma humano contém de 20.000 a 25.000 genes codificadores de proteínas distribuídos em 23 pares de cromossomos. Estes diferentes genes representam sequências singulares do DNA que estão presentes em cópias únicas ou no máximo em apenas poucas cópias por genoma. Existem também vários tipos de sequências repetidas de DNA dentro do genoma. Estas estão divididas em duas classes principais: sequências moderadamente repetitivas (<10 cópias por genoma) e sequências altamente repetitivas (>10 cópias por genoma).

Algumas sequências moderadamente repetitivas do DNA consistem em genes que codificam ácidos ribonucleicos de transferência e ribossomais, os quais estão envolvidos na síntese de proteínas (Cap. 33), e histonas, que são proteínas integrantes do nucleossomo (a seguir). Outras sequências moderadamente repetitivas do DNA não possuem uma função útil conhecida, porém podem participar da associação das fitas de DNA e dos rearranjos cromossômicos durante a meiose. A sequência repetitiva mais bem-caracterizada em humanos é conhecida como sequência Alu. Entre 300.000 a 500.000 repetições Alu I com cerca de 300 pares de bases estão distribuídas ao longo do genoma humano, compreendendo de 3% a 6% do DNA total. Repetições individuais da sequência Alu podem variar de 10% a 20% de identidade. Sequências similares são encontradas em outros mamíferos e em eucariotos inferiores.

DNA-satélite

O DNA-satélite foi originalmente identificado como uma subfração do DNA com uma densidade de flutuação ligeiramente menor do que a do DNA genômico por causa de seu conteúdo maior de pares de bases AT. Ele consiste em agrupamentos de sequências pequenas, específicas da espécie, praticamente idênticas, que são repetidas em série por centenas de milhares de vezes. Esses agrupamentos são deficientes nos genes que codificam proteínas e são encontrados principalmente próximos aos centrômeros dos cromossomos, sugerindo que eles possam funcionar alinhando os cromossomos durante a divisão celular para facilitar a recombinação. Como essas sequências repetitivas cobrem longas extensões dos cromossomos (centenas a milhares de pares de quilobases; kb), a determinação das sequências dos DNA-satélites e o sequenciamento da região do centrômero d o DNA representam os principais desafios para se completar o sequenciamento dos genomas

eucarióticos.

DNA mitocondrial

O núcleo de células eucarióticas contém a maior parte do DNA da célula – o DNA genômico. Entretanto, o DNA também é encontrado na mitocôndria e em cloroplastos de plantas, o que é compatível com teorias "endossimbióticas" sobre a origem dessas organelas celulares; que diz que elas são parasitas que se adaptaram à vida intracelular durante a simbiose. O genoma mitocondrial tem um tamanho pequeno, é circular e codifica relativamente poucas proteínas. Nos seres humanos, o genoma mitocondrial codifica 22 tRNAs, dois rRNAs e 13 proteínas mitocondriais que estão envolvidas no aparato respiratório, incluindo subunidades da NADH desidrogenase, citocromo b, citocromo oxidase e ATPase.

O restante das proteínas encontradas na mitocôndria (cerca de 1.000) é produzido de genes nucleares, sintetizado no citoplasma nos ribossomos "livres" e, então, importado para a mitocôndria. Esse processo de importação requer uma sequência N-terminal especial de importação para a mitocôndria, com cerca de 25 aminoácidos, a qual forma uma hélice anfipática que interage com proteínas transportadoras e chaperonas nas membranas mitocondriais interna e externa e na matriz mitocondrial. Essas poucas proteínas codificadas pelo genoma mitocondrial são sintetizadas na mitocôndria utilizando uma maquinaria similar a que é usada no citoplasma para a síntese de proteínas não mitocondriais (Cap. 33).

O DNA está compactado em cromossomos

Em eucariotos, o DNA está disposto em segmentos lineares chamados cromossomos. Cada cromossomo contém entre 48 milhões e 240 milhões de pares de bases. A forma B do DNA tem um comprimento de 3,4 Å por par de bases. Consequentemente, os cromossomos possuem comprimentos de 1,6 a 8,2 cm, o que é muito maior do que uma célula. Para caber dentro do núcleo, o DNA é condensado mais de 8.000 vezes em uma estrutura organizada. As interações entre o DNA e cátions móveis, tais como Na^+, Mg^{2+} e poliaminas, como espermidina^{3+}, desempenham um importante papel nas propriedades físicas e nas funções biológicas do DNA. Mesmo em soluções diluídas, aproximadamente três de quatro cargas no DNA são neutralizadas por um cátion que está de algum modo "ligado". Essa neutralização facilita a compactação do DNA no genoma densamente empacotado das células e a mudança conformacional do DNA pelas proteínas.

No cromossomo nativo, o DNA está complexado com o RNA e com uma massa aproximadamente igual de proteínas. Esses complexos DNA-RNA-Proteína são denominados cromatina. A maior parte das proteínas na cromatina é histona. As histonas constituem uma família de proteínas altamente conservadas que estão envolvidas no empacotamento e dobramento do DNA dentro do núcleo. Existem cinco classes de histonas, chamadas H1, H2A, H2B, H3 e H4. Todas são ricas (> 20%) em aminoácidos básicos (lisina e arginina) carregados positivamente. Essas cargas positivas interagem com os grupamentos fosfatos das fitas do DNA carregados negativamente para reduzir a repulsão eletrostática e permitir um empacotamento mais forte do DNA.

Nucleossomos

As proteínas histonas se associam a um complexo denominado nucleossomo (Fig. 31.4). Cada um desses complexos contém duas moléculas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4, e uma molécula de H1. O complexo proteico nucleossomal encontra-se envolvido com cerca de 200 pares de bases do DNA que formam duas espirais em torno do cerne do nucleossomo. A proteína H1 se associa à parte externa do cerne do nucleossomo, estabilizando o complexo. Com a formação de nucleossomos, a densidade de empacotamento do DNA é aumentada cerca de sete vezes.

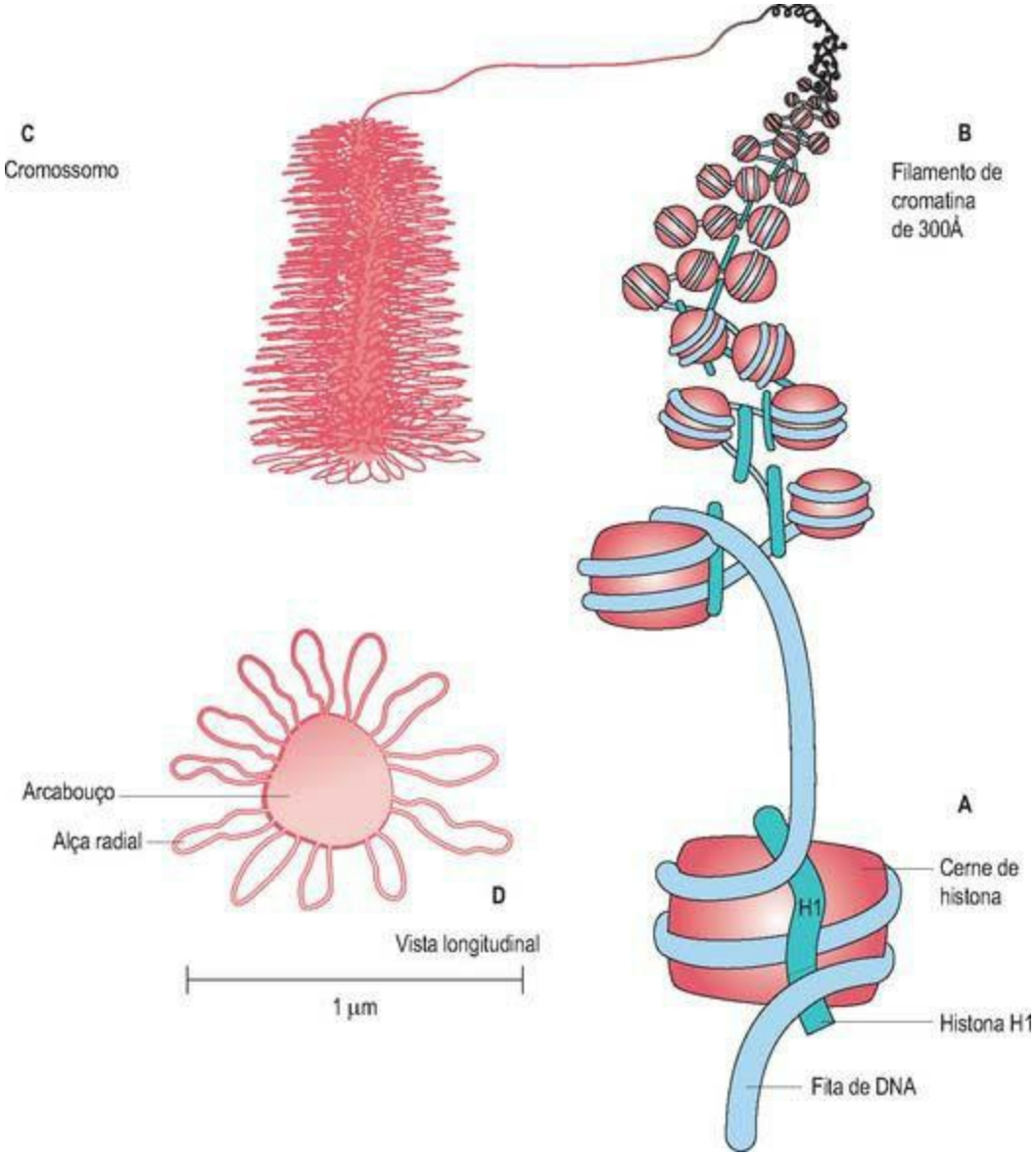


Fig. 31.4 Estruturas envolvidas no empacotamento dos cromossomos. (A) O cerne do nucleossomo é composto de duas subunidades de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. O cerne é enrolado duas vezes com o DNA, e a histona H1 se liga ao complexo completo. (B) O filamento de cromatina de 300 Å é formado pelo enrolamento dos nucleossomos em uma estrutura solenoide de forma espiralada. (C) O cromossomo é composto de filamentos de 300 Å, o qual se liga ao arcabouço nuclear, formando grandes alças de material de cromatina. (D) A vista longitudinal de um cromossomo mostra o arcabouço nuclear central envolvido pelas alças radiais de cromatina. O diâmetro de um cromossomo é de cerca de 1 μm.

As partículas de nucleossomos por si próprias também são organizadas em outras estruturas mais fortemente compactadas, chamadas filamentos de cromatina de 300 Å. Esses filamentos são construídos pelo enrolamento das partículas de nucleossomos em uma estrutura solenoide de forma espiralada com cerca de seis nucleossomos por volta (Fig. 31.4). O solenoide é estabilizado pelas associações das extremidades (do tipo cabeça a cauda) das histonas H1. Finalmente, os filamentos de cromatina são compactados no cromossomo maduro, usando um arcabouço nuclear. Este arcabouço possui cerca de 400 nm de diâmetro e forma o cerne dos cromossomos. Os filamentos estão dispersos em torno do arcabouço formando alças radiais de cerca de 300 nm de comprimento. O diâmetro final do cromossomo é de aproximadamente 1 μm.

Telômeros

As extremidades dos cromossomos são compostas por sequências únicas de DNA denominadas telômeros. Essas estruturas consistem em repetições *in tandem* de oligonucleotídeos pequenos, ricos

em G e específicos da espécie. Nos seres humanos, a sequência repetitiva é TTAGGG. Os telômeros podem conter até 1.000 cópias desta sequência. Durante a síntese dos telômeros, a enzima telomerase adiciona as repetições do hexanucleotídeo pré-formado à extremidade 3′ do cromossomo; não há necessidade de um DNA molde para o alongamento dos telômeros. O encurtamento do telômeros após muitas replicações celulares têm sido associado ao desenvolvimento de senescência celular (quadro de conceito avançado e Cap. 44).

O CICLO CELULAR EM EUCARIOTOS

A Figura 31.5 mostra as várias fases do crescimento e divisão de células eucarióticas, conhecido como ciclo celular. A fase G1 é um período de crescimento celular que ocorre anteriormente à replicação do DNA. A fase durante a qual o DNA é sintetizado ou replicado é chamada fase S. Uma segunda fase de crescimento, denominada G2, ocorre após a replicação do DNA, porém antes da divisão celular. A mitose, ou fase M, é o período de divisão celular. Após a mitose, as células filhas entram novamente na fase G1 ou entram em uma fase quiescente denominada G0, quando o crescimento e a duplicação cessam. A passagem das células pelo ciclo celular é rigorosamente controlada por uma variedade de proteínas denominadas quinases dependentes de ciclina (Cap. 43).

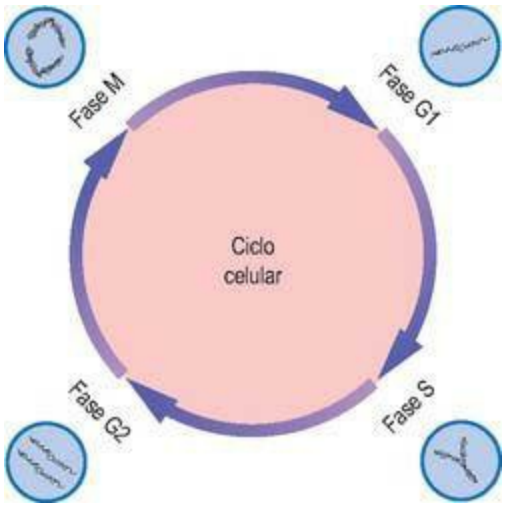


Fig. 31.5 Estágios do ciclo celular. G1 e G2 são fases de crescimento que ocorrem antes e depois da síntese de DNA, respectivamente. A replicação do DNA ocorre durante a fase S. A mitose ocorre durante a fase M, resultando em duas células filhas novas que podem entrar novamente na fase G1 (compare com a Figura 43.1).

O DNA é replicado pela separação e cópia das fitas

Para as células se dividirem seu DNA deve ser duplicado durante a fase S do ciclo celular. A estrutura do DNA dupla hélice e sua complementaridade sugerem o mecanismo para a replicação do DNA – separação das fitas seguida de cópia destas. As fitas parentais separadas servem como molde para a síntese de novas fitas filhas. Este método de replicação do DNA é descrito como "semiconservativo" – em cada dúplex replicado, a molécula de DNA filha contém uma fita parental e uma fita recém-sintetizada.

Sítio de replicação do DNA

O local no qual a replicação do DNA se inicia é chamado "origem de replicação". Em procariotos, uma proteína de ligação do DNA, chamada DnaA, liga-se a sequências repetidas de nucleotídeos localizadas na origem. A ligação de 20 a 30 moléculas de DnaA à origem de replicação induz o desenovelamento, o que separa as fitas em uma região rica em AT adjacente aos sítios de ligação da DnaA. Em seguida, a proteína hexamérica DnaB se liga à s fitas de DNA separadas. A DnaB possui atividade de helicase, catalisando o desenovelamento mediado por ATP da hélice de DNA. A DNA girase também participa da separação das fitas. Como esse complexo continua a desenovelar as fitas de DNA em ambas as direções partindo da origem de replicação, proteínas que se ligam ao DNA de fita simples revestem as fitas separadas para inibir sua reassociação.

Quando as fitas se encontram devidamente separadas, outra proteína, denominada DNA primase, é adicionada, resultando na formação do complexo primossomo na forquilha de replicação. O primossomo sintetiza oligonucleotídeos de RNA complementares a cada uma das fitas do DNA parental. Esses oligonucleotídeos servem como iniciadores para a síntese de DNA. Quando cada iniciador de RNA tiver sido posicionado, dois complexos de DNA polimerase III são montados, um em cada sítio, com os devidos iniciadores. Por causa da atividade sintética unidirecional da polimerase e a natureza antiparalela das duas fitas, a síntese de DNA ao longo das duas fitas é diferente (Fig. 31.6). As duas fitas filhas que estão sendo sintetizadas são denominadas fita contínua e fita descontínua.

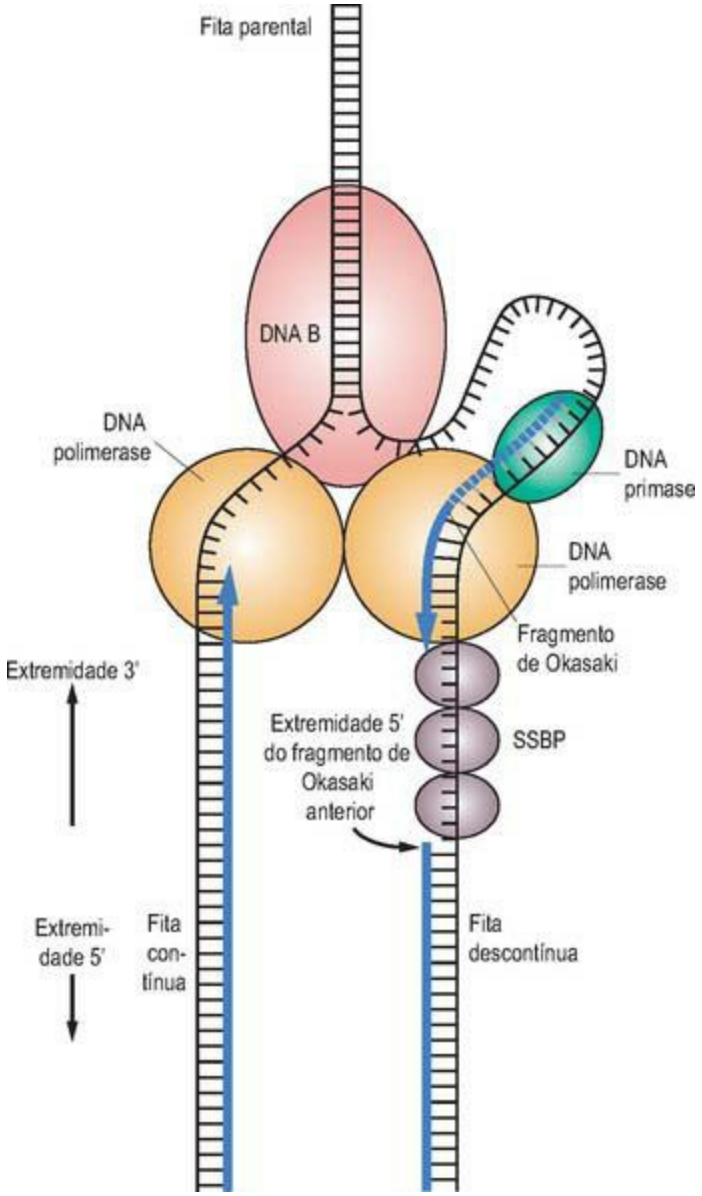


Fig. 31.6 Síntese de DNA. A síntese de DNA ocorre em uma forquilha de replicação, produzindo novas fitas denominadas fita contínua e fita descontínua. Os "trilhos" representam o DNA de fita dupla. Algumas das enzimas envolvidas na síntese de DNA são mostradas: DNA B (helicase), DNA primase, DNA polimerase e proteína que se liga a DNA de fita simples (SSBP). A fita contínua é replicada continuamente. Entretanto, para a fita descontínua, os iniciadores de RNA são periodicamente adicionados pela DNA primase ao longo da fita. A DNA polimerase III alonga esses iniciadores de RNA para formar fragmentos de Okasaki. Quando o fragmento de Okasaki está completo, a DNA polimerase III na fita descontínua se deslocará para o iniciador de RNA seguinte para iniciar outro fragmento de Okasaki. A atividade de exonuclease da DNA polimerase I remove os iniciadores de RNA e os substitui por DNA. A DNA ligase sela as lacunas nas fitas de DNA para completar a síntese da fita descontínua.

A síntese de DNA se passa ao longo da fita contínua na direção 5′ para 3′, produzindo uma fita simples, longa e contínua. Entretanto, como a síntese de DNA adiciona novos nucleotídeos somente na extremidade 3′ da fita de DNA que está sendo formada, a DNA polimerase III não pode sintetizar a fita descontínua em um pedaço contínuo e longo, tal como é feito para a fita contínua. Em vez disso, a fita descontínua é sintetizada em pequenos fragmentos, de 1.000 a 5.000 pares de bases de comprimento, denominados fragmentos de Okasaki (Fig. 31.6). O primossomo permanece associado à fita descontínua e continua periodicamente a sintetizar iniciadores de RNA complementares à fita de DNA separada. À medida que a DNA polimerase III se move ao longo da fita de DNA parental, ela inicia a síntese dos fragmentos de Okasaki nos iniciadores de RNA, alongando diferentes fragmentos e cada iniciador.

Quando a extremidade 3′ do fragmento de Okasaki crescente alcança a extremidade 5′ do fragmento de Okasaki sintetizado anteriormente, a DNA polimerase III libera o molde e encontra outro iniciador de RNA mais adiante ao longo da fita descontínua, sintetizando outro fragmento de Okasaki. Por fim os fragmentos de Okasaki são unidos pela DNA polimerase I. Esta enzima, que também possui uma função no reparo do DNA, tem uma atividade de exonuclease que permite remover e substituir uma extensão de nucleotídeos à medida que ela prossegue ao longo de um DNA molde. Durante a replicação do DNA, a DNA polimerase I remove o iniciador de RNA e o substitui por DNA. Finalmente, a DNA ligase une os fragmentos de DNA da fita descontínua para formar uma fita contínua.

Os eucariotos regulam rigorosamente a replicação do DNA

A síntese de DNA em eucariotos é notavelmente similar à síntese de DNA em procariotos. Entretanto, os eucariotos possuem muito mais origens de replicação. Estas são ativadas simultaneamente durante a fase S do ciclo celular, permitindo uma rápida replicação de todo o cromossomo. Para assegurar que quantidades excessivas de segmentos de DNA que estão se replicando mas estão inacabados não se acumulem, as células utilizam uma proteína chamada fator licenciador, que está presente no núcleo antes da replicação. Após cada ciclo de replicação este fator é inativado ou destruído, prevenindo uma replicação posterior até que mais fator licenciador seja posteriormente sintetizado no ciclo celular.

BIOQUÍMICA DE DNA POLIMERASES EM *ESCHERICHIA COLI*

Existem vários tipos diferentes de DNA polimerases em *E. coli*. A DNA polimerase III, a principal enzima de replicação do DNA, tem a maior taxa de polimerização do DNA. A DNA polimerase I está envolvida no reparo por excisão e na remoção de iniciadores de RNA dos fragmentos de Okasaki. A DNA polimerase III é um complexo proteico, com pelos menos 10 subunidades distintas, variando em tamanho de 12 kDa a 130 kDa. Ela requer um molde de fita simples e um iniciador, DNA ou RNA. Após se ligar ao complexo molde-iniciador, a enzima primeiro determina qual nucleotídeo é complementar ao próximo nucleotídeo disponível do molde e permite que o nucleotídeo se ligue ao sítio ativo. A reação de alongamento ocorre quando a 3′-hidroxila da base anterior ataca o 5′-fosfato do desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) seguinte, com liberação de um pirofosfato. Este processo resulta em alongamento da fita de DNA por um nucleotídeo. Posteriormente, em um processo chamado edição (*proofreading*), a enzima checa se a base recém-incorporada pode formar um par de bases Watson-Crick (isto é, AT, TA, CG ou GC) com a base oposta da fita molde. Se o par de bases não pode ser formado, a enzima remove o último nucleotídeo adicionado e repete o processo. Se o par de bases pode ser formado, a enzima avança um nucleotídeo ao longo da fite molde e repete o processo. A capacidade da DNA polimerase III de editar as sequências de DNA e substituir nucleotídeos pareados incorretamente serve para manter a alta fidelidade da replicação do DNA.

TERAPIA DA INFECÇãO POR HIV COM AZT

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) resulta em um profundo

enfraquecimento do sistema imune, deixando o paciente suscetível a uma variedade de superinfecções por bactérias, fungos, protozoários e vírus. O sarcoma de Kaposi pode também se desenvolver; é uma doença tipo câncer dos vasos sanguíneos causada pela infecção pelo herpesvírus humano 8 (HHV-8).

Tratamentos efetivos da infecção por HIV contam com o conhecimento detalhado do ciclo de vida do vírus. Para o vírus da AIDS, o genoma viral é RNA. Na célula infectada, este RNA é copiado a uma forma de DNA por uma enzima viral denominada transcriptase reversa. Esta enzima é propensa a erros uma vez que não possui a capacidade de edição da DNA polimerase III. Uma abordagem terapêutica para o tratamento da AIDS tira vantagens da "promiscuidade" da enzima na escolha de substratos. Várias drogas antivirais importantes são análogos de nucleotídeos que inibem a transcriptase reversa, incluindo o AZT (azido-2′,3′-didesoxitimidina; Retrovir®, Zidovudina), o ddc (2′-3′-didesoxicitidina; Hivid®, Zalcitabina) e o 3TC (2′3′-didesoxi-3′-tiacitidina; Epivir®, Lamivudina). O AZT, por exemplo, é metabolizado no organismo em um análogo de trifosfato de timidina (TTP), o azido-TTP. A transcriptase reversa do HIV incorpora o azido-TTP no genoma viral que sofreu a transcrição reversa. A incorporação do azido-TTP bloqueia o alongamento da cadeia, porque o grupamento 3′-azido não pode formar uma ligação fosfodiéster com o trisfosfato de nucleosídeo subsequente. A incapacidade de sintetizar DNA do molde de RNA viral resulta em inibição da replicação viral (Fig. 31.7).

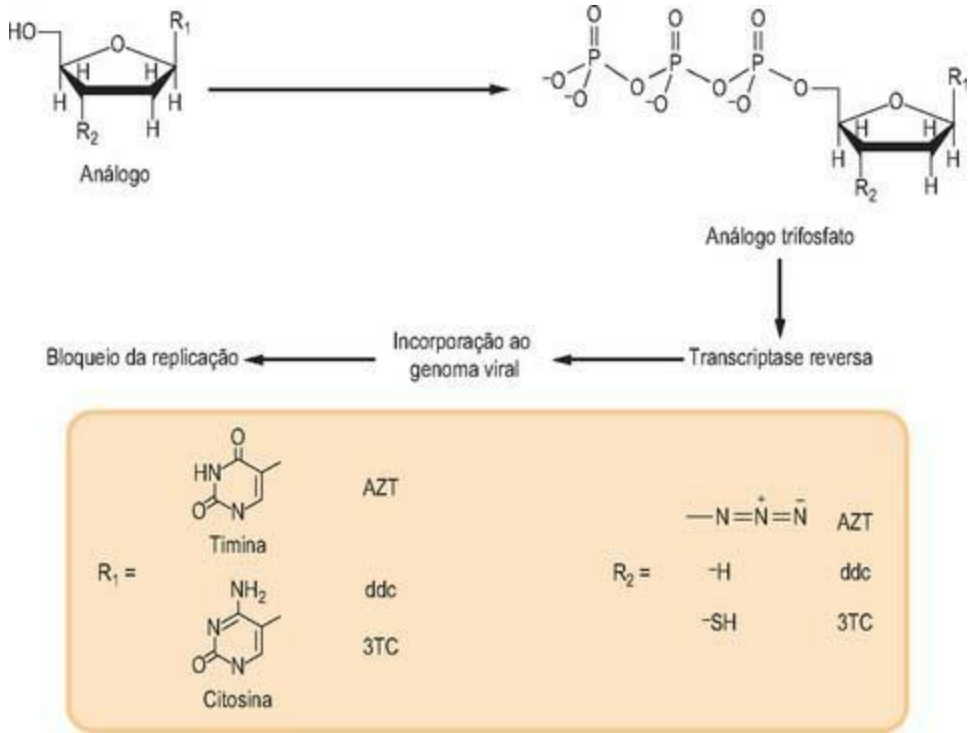


Fig. 31.7 Mecanismo de ação de agentes quimoterápicos antirretrovirais. Esta classe de inibidores inclui vários compostos com estruturas químicas ligeiramente diferentes na estrutura da nucleobase e na substituição do carbono 3′ do anel do açúcar. As estruturas de algumas das drogas mais usadas são mostradas. Esses compostos são metabolizados em forma trifosfato via metabolismo celular normal (Cap. 30). Os análogos de trifosfatos são, então, incorporados ao genoma viral pela transcriptase reversa. Isto bloqueia a síntese de DNA viral porque a extremidade 3′R_2 modificada da molécula de DNA viral não é substrato para os ciclos posteriores da síntese de DNA.

O fator licenciador é mais bem-compreendido em leveduras. Nelas existe um complexo denominado complexo de reconhecimento da origem (ORC), composto por seis proteínas. O ORC

marca a origem de replicação e permanece ligado à origem ao longo do ciclo celular. Ele serve como um sítio de ancoragem para outros componentes que regulam a replicação do DNA. Eventos iniciais da replicação do DNA incluem a ligação de várias proteínas altamente instáveis ao ORC. Essas proteínas incluem as CDC6/18 e CDT1, as quais facilitam a ligação de um grupo de três proteínas adicionais: MCM2, MCM3 e MCM5. Quando as proteínas MCM se ligam, a origem existe como um complexo de pré-replicação tornando-se "licenciada" ("autorizada") para entrar na fase S do ciclo celular. A iniciação da síntese de DNA é desencadeada pela ação da quinase CDC7 juntamente com outras quinases dependentes de ciclinas. Em seguida, o complexo MCM ativado participa do desenovelamento da origem de replicação e, assim, é deslocado da origem. Após o deslocamento, a origem forma um complexo de pós-iniciação e a CDC6 é degradada, prevenindo, dessa forma, uma nova exposição da origem com fatores licenciadores adicionais.

REPARO DO DNA

Como o DNA é o reservatório da informação genética dentro da célula, é importantíssimo manter a sua integridade. Portanto, a célula desenvolveu inúmeros mecanismos altamente eficientes para o reparo de DNA modificado ou danificado.

Tipos de danos ao DNA: mais de 10.000 modificações por célula diariamente

O DNA pode ser danificado por inúmeros tipos de agentes endógenos e exógenos que causam modificações nos nucleotídeos, deleções, inserções, inversões de sequências e transposições. Alguns desses danos são secundários a modificações químicas do DNA por agentes alquilantes (incluindo muitos carcinógenos), espécies reativas de oxigênio (Cap. 37) e radiação ionizante (ultravioleta ou radioativa). Tanto o açúcar quanto as bases de DNA estão sujeitos a modificações, e estima-se que de 10.000 a 100.000 modificações do DNA sejam geradas por célula diariamente. A natureza desses danos é bastante variável, incluindo modificações de bases únicas, quebras de fitas simples ou dupla, e ligação cruzada entre bases ou entre bases e proteínas. O dano oxidativo é provavelmente a forma mais comum de dano ao DNA; ele é aumentado na inflamação, com o fumo, no envelhecimento e em doenças relacionadas à idade, incluindo ateroesclerose, diabetes e doenças neurodegenarativas (Cap. 44). Se não for reparado, o acúmulo de danos levará a alterações permanentes na estrutura do DNA, estabelecendo o estágio de perda das funções celulares, morte celular ou câncer.

Inúmeros agentes químicos e ambientais são conhecidos por produzirem modificações químicas específicas dos nucleotídeos na fita de DNA, levando ao pareamento incorreto durante a síntese de DNA. Após a replicação dos cromossomos, a fita filha resultante contém uma sequência de DNA diferente (mutação) da fita parental. As células utilizam o reparo por excisão para remover nucleotídeos alquilados e outros análogos de bases incomuns, protegendo, assim, a sequência de DNA de mutações. As fitas não modificadas servem como molde para o processo de reparo.

A luz ultravioleta produz dímeros de timina: reparo por excisão de nucleotídeo

Quando a luz ultravioleta (UV) de ondas curtas interage com o DNA, bases de timina adjacentes sofrem uma dimerização incomum, produzindo um dímero de ciclobutiltimina na fita de DNA (Fig. 31.8). O primeiro mecanismo de reparo desses dímeros de timina intrafita é um mecanismo de reparo por excisão. Uma endonuclease, que parece ser específica para este tipo de modificação, cliva a fita que contém o dímero próximo ao dímero de timina, e uma pequena porção desta fita é removida. A DNA polimerase I, a mesma enzima envolvida na biossíntese de DNA, então, reconhece e preenche a lacuna resultante. A DNA ligase completa o reparo pela reunião das fitas de DNA.

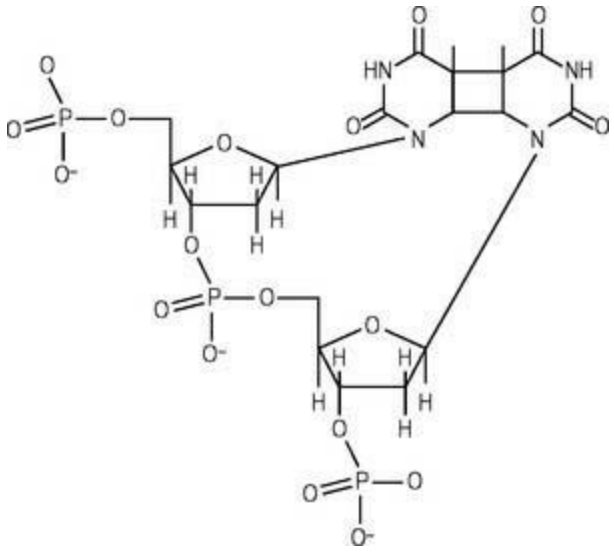


Fig. 31.8 Dímero de timina. Um dímero de timina consiste em um anel de ciclobutano unindo um par de nucleotídeos de timina adjacentes.

Desaminação: reparo por excisão

Os nucleotídeos que contêm amina, citosina e adenosina podem desaminar espontaneamente para formar uracila e hipoxantina, respectivamente. Quando essas bases são encontradas no DNA, *N*-glicosilases específicas removem-nas. Isto produz lacunas de pares de bases que são reconhecidas por endonucleases apurínicas ou apirimidínicas específicas que clivam o DNA próximo ao sítio defeituoso. Posteriormente uma exonuclease remove um trecho da fita de DNA contendo o defeito. Uma DNA polimerase de reparo substitui o DNA e, finalmente, uma DNA ligase reúne a fita de DNA. Esse mecanismo de reparo também é denominado reparo por excisão.

Depurinação

Alterações de um único par de bases também incluem depurinação. As ligações purina-N-glicosídicas são especialmente instáveis, de forma que se estima que de três a sete purinas são removidas do DNA por minuto por célula. Enzimas específicas reconhecem esses sítios depurinados e a base é substituída sem interrupção do esqueleto fosfodiéster.

XERODERMA PIGMENTOSUM

O xeroderma pigmentosum (XP) é um grupo de distúrbios autossômicos recessivos raros que colocam em risco a vida do paciente (incidência 1/250.000) e são caracterizados por extrema sensibilidade à luz solar. Sob exposição à luz solar ou à radiação ultravioleta, surgem na pele de pacientes com XP manchas pontuais pigmentadas, parecidas com sardas. Carcinomas múltiplos e melanomas aparecem precocemente na vida, exacerbados pela exposição ao sol, e a maioria dos pacientes sucumbe ao câncer antes de atingirem a idade adulta.

O XP é resultado de um defeito no reparo de dímeros de timina induzidos por UV no DNA. Existem pelo menos oito polipeptídeos (genes) envolvidos no reconhecimento, desenovelamento e reparo por excisão de dímeros de timina induzidos por UV. Pacientes com XP devem evitar luz solar direta, luz fluorescente, luz halógena ou qualquer outra fonte de luz ultravioleta. Uma forma experimental de terapia proteica atualmente sob investigação clínica envolve a aplicação de uma loção cutânea contendo a proteína ou a enzima ausente. De um modo ideal, esta proteína penetrará

nas células da pele e estimulará o reparo do DNA danificado por UV. Entretanto, a proteção ocorre somente onde a loção possa ser aplicada. Por exemplo, este tratamento não engloba problemas neurológicos que afetam cerca de 20% dos pacientes com XP.

Quebras de fitas

Quebras de fita simples são frequentemente induzidas por radiação ionizante. Estas são reparadas por ligação direta ou por mecanismos de reparo por excisão. Quebras em fita dupla são produzidas por radiação ionizante e alguns agentes quimioterápicos. Por sua vez, as extremidades dupla fita do DNA são raras *in vivo*; elas são encontradas nas extremidades dos cromossomos e em alguns complexos especializados envolvidos no rearranjo de genes. Um sistema enzimático especializado é desenhado para reconhecer e religar essas extremidades, porém se as extremidades estão afastadas umas das outras, o dano não é facilmente reparado.

Reparo de pareamentos incorretos

Erros que escapam da atividade de edição da DNA polimerase III aparecem no DNA recém-sintetizado sob a forma de pareamentos incorretos de nucleotídeos. Embora prontamente reparável, a questão crítica é a identificação da fita a ser reparada: qual fita de nucleotídeos é a fita filha contendo o erro? Em sistemas bacterianos, o reparo de pareamentos incorretos é realizado por metilação do DNA nos resíduos de adenina em sequências específicas espaçadas ao longo do genoma; a metilação não afeta o pareamento entre as bases. As fitas recém-sintetizadas não apresentam resíduos de adenina metilados, de forma que as enzimas do sistema de reparo de pareamentos incorretos exploram o DNA, identificam o pareamento incorreto e, então, reparam a fita não metilada com o reparo por excisão. Uma abordagem similar é utilizada para corrigir pareamentos incorretos que ocorrem durante a síntese do DNA de mamíferos. Defeitos no reparo de pareamentos incorretos estão associados ao câncer de cólon não polipose hereditário, uma condição autossômica dominante em humanos.

8-oxo-2′-desoxiguanosina

Cerca de 20 modificações oxidativas diferentes do DNA foram caracterizadas; a mais estudada é a 8-oxo-2′-desoxiguanosina (8-oxoG) (Fig. 31.9). Durante o processo de replicação do DNA, pareamentos incorretos entre o nucleosídeo modificado 8oxoG na fita molde e o nucleotídeo trifosfato seguinte resulta na transversão G para T, introduzindo, assim, mutações na fita de DNA. Embora mecanismos de reparo por excisão sejam eficazes, a 8-oxoG, tal qual outras bases modificadas, pode ser reincorporada ao DNA após a excisão.

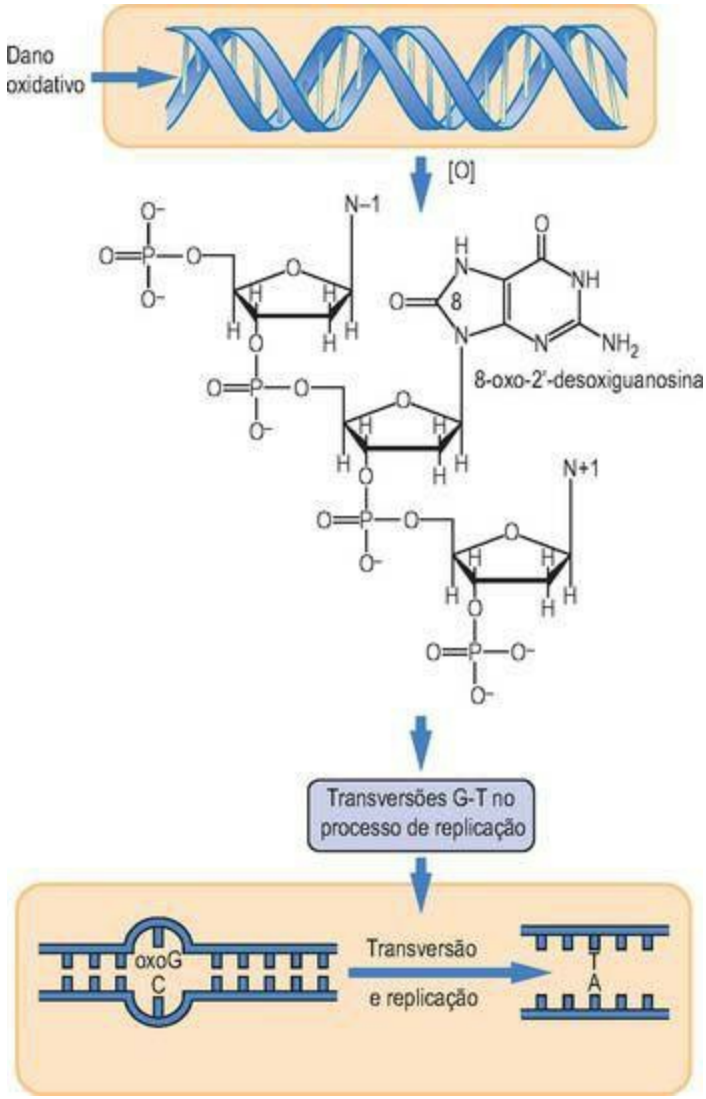


Fig. 31.9 Dano oxidativo ao DNA. A 8-oxo-2′-desoxiguanosina (oxoG) é uma modificação oxidativa do DNA que causa mutações durante a replicação do DNA. A replicação da fita contendo oxoG frequentemente gera uma pirimidina A na fita complementar que, nas replicações posteriores, gera um par de bases AT ao invés do par de bases GC original.

Recentemente, uma proteína de mamífero, a MTH1, foi caracterizada por degradar especificamente a 8-oxo-dGTP, prevenindo, portanto, a incorporação errada deste nucleotídeo alterado no DNA. A terapia gênica foi utilizada para desenvolver um camundongo *knockout* para MTH1. Comparado com o animal selvagem, o *knockout* apresentou um número maior de tumores no pulmão, fígado e estômago, ilustrando a importância deste (e de outros) mecanismos de proteção pós-reparo.

TESTE DE AMES PARA MUTAGÊNICOS

Mutagênicos são compostos químicos que induzem mudanças na sequência de DNA. Um grande número de agentes químicos naturais e artificiais é mutagênico. Para avaliar o potencial de mutação do DNA, o bioquímico americano Bruce Ames desenvolveu um teste simples, usando linhagens especiais de *Salmonella typhimurium* que não podem crescer na ausência de histidina (fenótipo His^-). Essas linhagens auxotróficas para histidina contêm substituições de nucleotídeos ou deleções que impedem a produção de enzimas da biossíntese de histidina.

Para testar quanto à mutagênese, as bactérias mutantes são semeadas em um meio de cultura na

ausência de histidina; o mutagênico em teste é adicionado ao meio. A ação do mutagênico ocasionalmente resulta na reversão da mutação da histidina, gerando uma linhagem reversa que pode agora sintetizar histidina e crescerá na sua ausência. A mutagenicidade de um composto é medida pela contagem do número de colônias que cresceram, ou seja, reverteram para o fenótipo His^+. Há uma boa correlação entre os resultados do teste de mutagenicidade de Ames e testes diretos de atividade carcinogênica em animais.

Alguns agentes químicos (pró-carcinógenos) não são mutagênicos *per se*, mas são ativados para compostos mutagênicos durante os processos metabólicos, por exemplo, durante a desintoxicação de drogas no fígado ou nos rins. O benzopireno, por exemplo, não é mutagênico, mas durante sua desintoxicação no fígado é convertido em diolepóxidos, que são potentes mutagênicos e carcinógenos. Para fornecer sensibilidade de detecção de pró-carcinógenos o meio de cultura é suplementado com um extrato microssomal de fígado, uma subfração de tecido rica em retículo endoplasmático liso contendo enzimas metabolizadoras de drogas.

Em células de pulmão, a inalação de alguns materiais particulados resultam em aumento dos níveis de 8-oxoG. O processo inflamatório pode desempenhar uma função na formação de tumores de pulmão induzida por asbestos. O tabagismo também induz dano oxidativo e aumenta os níveis de produtos de oxidação do DNA nos pulmões, no sangue e na urina. A 8-oxoG é usada como marcador de estresse oxidativo em vários estudos clínicos (Cap. 44).

Resumo

O genoma humano é composto de DNA, um polímero de desoxirribonucleotídeos, antiparalelo e dupla fita helicoidal, estabilizado por pontes de hidrogênio entre as bases complementares. O DNA está empacotado no cromossomo em uma estrutura condensada altamente organizada. A informação genética é replicada por um mecanismo semiconservativo, no qual as fitas parentais são separadas e ambas servem como moldes para o DNA filho. A replicação do DNA é um processo complexo e rigorosamente regulado. O DNA é essencialmente o único polímero no organismo que é preferencialmente reparado, em lugar de ser degradado, por meio de modificações químicas e biológicas. Os mecanismos de reparo geralmente envolvem excisão de bases modificadas e substituição, usando a fita não modificada como molde.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Quais são as possíveis funções de formas incomuns de DNA?

2. Discuta as possíveis funções das sequências moderadamente e altamente repetitivas do DNA.

3. O câncer de cólon não polipose hereditário resulta de um defeito no mecanismo de reparo de pareamentos incorretos. Por que esta condição é autossômica dominante?

4. Quais são as diferenças na replicação e no reparo entre o DNA nuclear e o DNA mitocondrial?

Leituras sugeridas

Burhans WC, Weinberger M. DNA replication stress, genome instability and aging. *Nucleic Acids Res*. 2007;25:2045-2056.

Cleaver JE, Crowley E. UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. *Front Biosci*. 2002;7:1024-1043.

Georgakilas AG. Processing of DNA damage clusters in human cells: current status of knowledge. *Mol Biosyst*. 2008;4:30-35.

Pavlov YI, Shcherbakova PV, Rogozin IB. Roles of DNA polymerases in replication, repair, and recombination in eukaryotes. *Int Rev Cytol*. 2006;255:41-132.

Slijepcevic P. DNA damage response, telomere maintenance and ageing in light of the integrative model. *Mech Ageing Dev*. 2008;129:11-16.

Spry M, Scott T, Pierce H, D'Orazio JA. DNA repair pathways and hereditary cancer susceptibility syndromes. *Front Biosci*. 2007;12:4191-4207.

Venter JC, Adams MD, Myers EW. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291:1304-1351.

Watson JD. A passion for DNA. Genes, genomes and society. Oxford: Oxford University Press, 2000.

Watson JD. The double helix: a personal account of the discovery of the structure of DNA. New York: WW Norton, 1980.

Sites

DNA interativo DNA interativo, Essa é a melhor introdução sobre o assunto. www.dnai.org.

DNA do início DNA do início. www.dnaftb.org.

National Human Genome Research Institute. http://www.genome.gov.

Workshop sobre DNA. www.pbs.org/wgbh/aso/tryit/dna.

Doenças genéticas Doenças genéticas. http://www.rarediseases.org.

Gráficos Gráficos. www.accessexcellence.org/AB/GG/structure.html.

Reparo do DNA. http://dir.niehs.nih.gov/dirlmg/DNArepair.html.

Replicação do DNA. http://dir.niehs.nih.gov/dirlmg/repl.html.

DNA mitocondrial DNA mitocondrial. http://www.mitomap.org.

Organização Organização de DNA e nucleossemos:

- http://medweb4.bham.ac.uk/jspdf/m102pdf/DNA1.pdf
- http://medweb4.bham.ac.uk/jspdf/m102pdf/DNA2.pdf

Ácido Ribonucleico

G.A. Bannon

R. Thornburg

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Identificar os principais tipos de RNA celular e a função de cada um deles.
- Descrever as principais etapas da transcrição de uma molécula de RNA.
- Explicar a função das diferentes RNA polimerases.
- Descrever as principais diferenças entre mRNAs procarióticos e eucarióticos.
- Descrever os diferentes eventos de processamento e *splicing* que ocorrem durante a síntese de mRNAs eucarióticos.

INTRODUÇãO

A transcrição é definida como a síntese de uma molécula de ácido ribonucleico (RNA) utilizando uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) como molde. Essa definição bastante simples descreve uma série de processos enzimáticos complexos que resultam na transferência da informação genética armazenada no DNA de fita dupla para uma molécula de RNA de fita simples que será utilizada pela célula para direcionar a síntese de suas proteínas, um processo conhecido como tradução. Existem três classes gerais de moléculas de RNA encontradas em células procarióticas e eucarióticas: RNA ribossomal (rRNA), RNA de transferência (tRNA) e RNA mensageiro (mRNA). Cada classe apresenta funções e tamanhos distintos (Tabela 32.1), descritos por suas taxas de sedimentação em uma ultracentrífuga (S, unidades de Svedberg) ou pelo seu número de bases (nt, nucleotídeo, ou kb, quilobase). Os procariotos possuem as mesmas três classes gerais de RNA dos eucariotos, mas os tamanhos e as características estruturais são diferentes:

- **RNA ribossomal (rRNA)** de procariotos consiste em três tamanhos diferentes de RNA, enquanto rRNA de eucariotos consiste em quatro tamanhos diferentes de RNA. Esses RNAs interagem uns com os outros e com proteínas para formar um ribossomo, que constitui a maquinaria básica na qual ocorre a síntese de proteínas.

- **RNAs de transferência (tRNAs)** consiste em uma classe única de tamanho de RNA, com 65-110 nt de comprimento; eles funcionam como carreadores de aminoácidos e como moléculas de reconhecimento que identificam a sequência de nucleotídeos do mRNA e a traduzem na sequência de aminoácidos das proteínas

- **RNAs mensageiros (mRNAs)** representam a classe mais heterogênea de RNAs encontrada nas células. Os mRNAs geralmente variam em tamanho de 500 nt a quase 6 kb (alguns mRNAs raros, porém muito importantes, possuem tamanho > 100 kb). Os mRNAs são carreadores da informação genética, definindo a sequência de todas as proteínas da célula; eles são as “cópias funcionais” do genoma.

Tabela 32.1 Classes gerais de RNA.

RNA	Tamanho e comprimento	Percentual de RNA celular total	Função
rRNA	28S, 18S, 5.8S, 5S (23S, 16S, 5 S)*	80	interagir para formar ribossomos
tRNA	65–110 nt	15	adaptador
mRNA	0,5–6 kb	5	direcionar a síntese de proteínas celulares

**Tamanho do rRNA em células procarióticas. nt, nucleotídeo; kb, quilobase; S, unidade de Svedberg.*

Para se compreender a série complexa de eventos que leva à produção dessas três classes de RNA, este capítulo é dividido em cinco partes. A primeira parte descreve a anatomia molecular dos principais tipos de RNA encontrados em células procarióticas e eucarióticas; sabendo, então, a natureza química dos produtos finais da transcrição, você estará mais preparado para entender as etapas envolvidas na geração dessas moléculas. A segunda parte descreve as principais enzimas envolvidas na transcrição e suas especificidades. A terceira parte descreve as três etapas (iniciação, alongamento e terminação) necessárias para se produzir uma proteína. Na quarta parte, as modificações que são feitas aos produtos primários da transcrição (processamento pós-transcricional) são descritas. Essa informação se econtra mais detalhada no capítulo 34. A quinta parte descreve resumidamente como as células regulam a expressão gênica ao nível de RNA.

ANATOMIA MOLECULAR DE MOLÉCULAR DE ÁCIDO RIBONUCLEICO

Em geral, os RNAs produzidos por células procarióticas e eucarióticas são moléculas de fita simples que consistem em nucleotídeos de adenina, guanina citosina e uracila unidos uns aos outros por ligações fosfodiéster. O início de uma molécula de RNA é conhecido como sua extremidade 5′ e a terminação é sua extremidade 3′. Muito embora a maioria dos RNAs seja de fita simples, eles apresentam uma extensa estrutura secundária, incluindo regiões de dupla fita intramoleculares que são importantes para sua função. Essas estruturas secundárias, uma das mais comuns é chamada alça em grampo (*hairpin loop*) (Fig. 32.1), são o produto de pareamentos intramoleculares de bases que ocorrem entre nucleotídeos complementares dentro de uma única molécula de RNA.

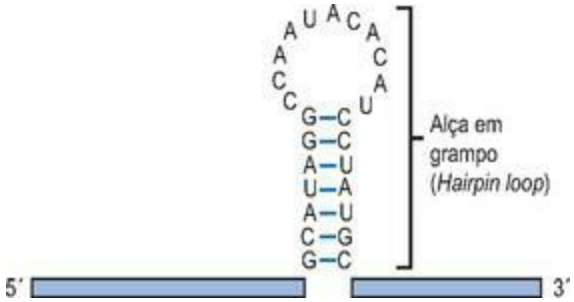


Fig. 32.1 Alça em grampo do RNA (*Hairpin loop*). O RNA pode formar estruturas secundárias chamadas alças em grampo (*hairpin loops*). Essas estruturas são formadas quando bases complementares dentro de um RNA individual compartilham pontes de hidrogênio e formam pares de bases. Alças em grampo são conhecidas por sua importância na regulação da transcrição tanto em células eucarióticas quanto em células procarióticas.

rRNAs: os RNAs ribossomais

Os rRNAs eucarióticos são sintetizados como um único transcrito de RNA com um tamanho de 45 S e cerca de 13 kb de comprimento. Esse longo transcrito primário é processado nos rRNAs 28S, 18S, 5,8S e 5S (aproximadamente 3 kb, 1,5 kb, 160 e 120 nt, respectivamente). Os rRNAs 28S, 5,8S e 5S se associam a proteínas ribossomais para formar a subunidade maior do ribossomo. O rRNA 18S se associa a proteínas ribossomais diferentes para formar a subunidade menor do ribossomo. A subunidade maior do ribossomo com suas proteínas e RNAs possui um tamanho característico de 60 S; a subunidade menor do ribossomo tem um tamanho de 40 S. Essas duas subunidades interagem para formar um ribossomo 80S funcional (Cap. 33). Os rRNAs procarióticos interagem de modo similar para formar essas subunidades ribossomais, porém possuem um tamanho um pouco menor, refletindo a diferença entre os tamanhos dos transcritos dos rRNAs de procariotos e eucariotos (Tabela 32.2).

Tabela 32.2 rRNAs e ribossomos. Os rRNAs interagem para formar os ribossomos.

Tipo celular	rRNA	Subunidade	Tamanho	Ribossomo intacto
Procarioto	23 S, 5 S	maior	50S	70S
	16 S	menor	30S	
Eucarioto	28 S, 5,8 S, 5 S	maior	60S	80S
	18 S	menor	40S	

tRNA: o trevo de quatro folhas molecular

Os tRNAS procarióticos e eucarióticos são similares tanto em tamanho quanto em estrutura. Eles apresentam extensa estrutura secundária e contêm vários ribonucleotídeos modificados derivados dos quatro nucleotídeos normais. Todos os tRNAs possuem uma dobra similar, com quatro alças distintas que foram descritas como trevo de quatro folhas (Fig. 32.2). A alça D contém várias bases modificadas, incluindo citosinas metiladas e di-hidrouridina, que conferiu o nome à alça. A alça do anticódon é a estrutura responsável pelo reconhecimento do códon complementar de uma molécula de mRNA; interação específica de um anticódon do tRNA com o códon apropriado do mRNA ocorre devido ao pareamento das bases entre essas duas sequências de trinucleotídeos complementares. Uma alça variável, de 3 a 21 nt de comprimento, existe na maioria dos tRNAs, mas sua função é desconhecida. Finalmente, existe uma alça TψC, que contém uma base modificada, a pseudouridina (ψ). Outra estrutura de destaque encontrada em todas as moléculas de tRNA é a haste aceptora. Esta estrutura é formada pelo pareamento de bases entre os nucleotídeos de cada uma das extremidades do tRNA. As últimas três bases encontradas na extremidade 3′ permanecem não pareadas, e sempre apresentam a mesma sequência: 5′-CCA-3′. Esta extremidade 3′ da haste aceptora é o ponto no qual um aminoácido é adicionado via uma ligação éster entre o grupamento 3′-hidroxila da adenosina e o grupamento carboxila de um aminoácido durante a síntese de proteínas (Cap. 33).

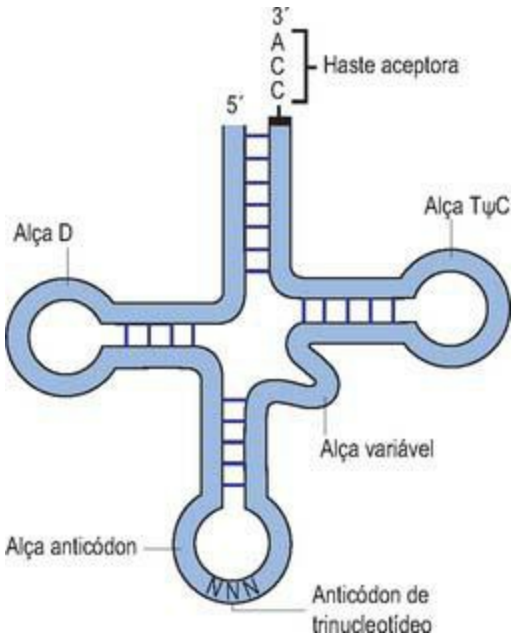


Fig. 32.2 A estrutura de uma molécula de tRNA. Um protótipo de molécula de tRNA é mostrado e as estruturas importantes para sua função estão indicadas. A estrutura geral da molécula é devida ao pareamento de bases complementares entre nucleotídeos dentro de um único RNA. Todos os tRNAs apresentam esta estrutura básica.

mRNA: procariotos e eucariotos possuem mRNAs diferentes

Procariotos e eucariotos são tipos de organismos muito diferentes com ciclos de vida bastante peculiares. Portanto, não é surpresa alguma que existam diferenças entre as estruturas de seus genes, seus mecanismos de transcrição e as estruturas de seus mRNAs. Na verdade, podemos explorar essas diferenças com novos antibióticos que possuem como alvos específicos etapas únicas do ciclo de vida de procariotos. Existe um grande número de diferenças importantes entre os mRNAs eucarióticos e procarióticos. Estas serão discutidas nas seções adiante. Resumidamente, essas diferenças são:

- as unidades transcricionais são estruturalmente diferentes: os mRNAs de procariotos são policistrônicos enquanto os mRNAs de eucariotos são monocistrônicos (Fig. 32.3),
- compartimentalização da transcrição e da tradução: os procariotos sintetizam RNA e proteínas em um único compartimento, os eucariotos separam esses eventos no núcleo e no citoplasma,
- proteção de suas extremidades 5′ e 3′: as extremidades dos mRNAs de procariotos são descobertas, e os mRNAs de eucariotos possuem uma proteção (*cap*) e uma cauda poli (A),
- processamento de mRNAs: os mRNAs de procariotos não são processados; os mRNAs de eucariotos contêm íntrons que são retirados durante o processo.

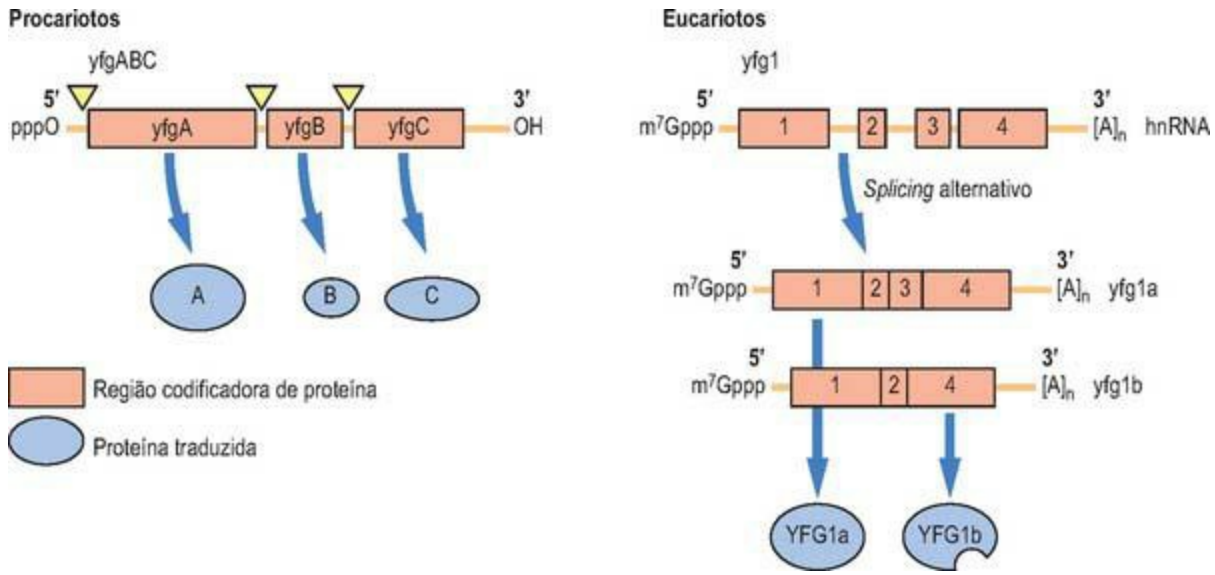


Fig. 32.3 Protótipos das estruturas de mRNAs procarióticos (policistrônico) e eucarióticos. Os mRNAs procarióticos possuem extremidades desprotegidas (trisfosfato na extremidade 5′ e hidroxila na extremidade 3′). As caixas indicam as porções do mRNA que codificam uma proteína. Os triângulos invertidos indicam a localização dos sítios de ligação de ribossomos. Os três genes neste cístron são traduzidos em três diferentes proteínas. Os transcritos nascentes de mRNA eucariótico (nuclear heterogêneo (hnRNA)) contêm tanto os éxons (caixas) quanto os íntrons (linhas). Os mRNAs eucarióticos são protegidos por um *cap* do nucleotídeo 7-metilguanina (m^7 Gppp), na extremidade 5′, e uma cauda poli A ($[A]_n$), na extremidade 3′. Após *splicing*, os mRNAs maduros consistem somente em éxons mais as UTRs 5′ e 3′. Os mRNAs que sofreram *splicing* alternativo são traduzidos em isoformas diferentes de proteínas. *ygf:* seu gene favorito; UTR: região não traduzida.

A principal diferença entre os mRNAs de procariotos e eucariotos é em relação à estrutura de sua unidade transcricional. Em procariotos, as unidades transcricionais geralmente contêm múltiplas

regiões codificadoras de proteínas (Fig. 32.3), enquanto em eucariotos cada unidade transcricional geralmente codifica somente uma única proteína. Os mRNAs policistrônicos de procariotos possuem códons individuais de iniciação e de parada no início e no final de cada fase de leitura aberta, ou seja, a sequência de mRNA que especifica a sequência da cadeia polipeptídica. Cada códon de parada é imediatamente seguido por outro sítio de ligação de ribossomo e um sítio de iniciação de tradução que funciona para a próxima fase de leitura aberta.

A segunda principal diferença entre os mRNAs procarióticos e eucarióticos é a compartimentalização dos processos de transcrição e tradução. Como os procariotos não possuem um núcleo, a transcrição e a tradução estão intimamente acopladas: a tradução procariótica geralmente se inicia antes do término do processo de transcrição. Em razão do acoplamento desses processos, os procariotos aumentam a taxa de expressão de proteínas, de maneira compatível com o tempo de vida relativamente curto desses organismos. Em contrapartida, as células eucarióticas separam a transcrição no núcleo da tradução no citoplasma. Embora esse arranjo atrase o tempo de resposta para a produção de uma proteína, ele permite um controle muito mais sutil de sua expressão.

O processamento pós-transcricional dos mRNAs é também significativamente diferente em procariotos e eucariotos. Devido a sua importância, essas diferenças serão descritas em uma seção separada mais adiante, em que se abordará o processamento pós-transcricional de RNAs. Resumidamente, os eucariotos protegem as extremidades 5′ e 3′ dos mRNAs pela adição de estruturas moleculares específicas (cap 5′ e cauda poli A) que têm como função reduzir a renovação (*turnover*) de mRNA. Além disso, os genes eucarióticos contêm íntrons, sequências não traduzidas que estão presentes em transcritos nascentes e devem ser retiradas para produção de mRNAs maduros.

POLIMERASES DE ÁCIDO RIBONUCLEICO

As RNAs polimerases são enzimas multiméricas grandes que transcrevem segmentos definidos do DNA em RNA com um alto grau de seletividade e especificidade

As enzimas responsáveis pela síntese de RNA são denominadas RNA polimerases (RNAPol). Ao contrário das DNAs polimerases (Cap. 31), as RNA polimerases não requerem um iniciador para iniciar a síntese de RNA. As RNAs polimerases geralmente consistem em duas subunidades de alto peso molecular e várias subunidades menores, todas as quais são necessárias para uma transcrição precisa. Os procariotos contêm uma única RNA polimerase que sintetiza todos os RNAs; entretanto, os eucariotos contêm três RNAs polimerases diferentes, denominadas RNAs polimerases I, II e III. Cada uma dessas polimerases é especializada na transcrição de uma classe de RNA.

- A RNAPol I transcreve RNAs ribossomais. Nas células eucarióticas, os rRNAs são produzidos de uma única unidade transcricional que é posteriormente processada para produzir os rRNAs 18S, 28S, 5,8S e 5S.

- A RNAPol III transcreve a maioria dos pequenos RNAs celulares (snRNAs, adiante), incluindo os tRNAs.

- A RNAPol II transcreve todos os outros genes dentro de uma célula eucariótica, incluindo todos os genes codificadores de proteínas que geram mRNA. A RNAPol II é bastante sensível à α-amanitina, um inibidor de transcrição potente e tóxico encontrado em alguns cogumelos venenosos.

A RNAPol II de leveduras consiste em um núcleo de 12 subunidades. Ela existe sob duas formas. A primeira é uma forma aberta que se parece com uma mão fechada com uma fenda que liga a molécula de DNA e os fatores de transcrição associados próximos ao ponto de início da transcrição. Após a desnaturação ou dissociação das fitas de DNA, o complexo sofre uma grande mudança conformacional que fecha a fenda, formando um grampo em torno da fita antissenso ou molde do DNA. Posteriormente, uma proteína específica (*rbp4/7*) se liga à base do grampo, trancando-o em um estado fechado. Essa forma fechada não é mais eficaz para o início da transcrição, mas é capaz de realizar o alongamento. A estrutura da RNAPol II de leveduras parece ser um excelente modelo para a enzima humana. Além disso, também é um bom modelo para as funções das RNAPol I e III porque as subunidades do núcleo são compartilhadas ou homólogas entre as várias enzimas.

A RNA polimerase de bactérias é similar ao complexo enzimático eucariótico, exceto que a enzima bacteriana contém somente quatro subunidades ($\alpha_2\beta\beta'$) e que, ao contrário da enzima eucariótica, requer somente um único fator de transcrição geral (fator σ) para reconhecer o promotor e recrutar a RNA polimerase para iniciar a transcrição.



ENVENENAMENTO POR α-AMANITINA: COLHENDO O COGUMELO ERRADO

Uma mulher jovem e saudável se apresenta à sala de emergência, de manhã cedo, com náusea intensa, cólica abdominal e diarreia abundante. Os sinais vitais da paciente indicam taquicardia e sua pele apresenta menor turgidez, o que indica desidratação. Enquanto relata seu histórico médico, a

paciente explica que seus sintomas começaram repentinamente, cerca de seis horas após ter jantado. Ante a suspeita de envenenamento alimentar, é pedido para a paciente relatar tudo o que ela havia comido nas últimas 24 horas. A paciente relata que comeu cogumelos no jantar e que estes foram colhidos em uma recente caminhada na floresta. O tratamento da paciente se inicia com salina e eletrólitos, para prover os fluidos perdidos, e também é dado carvão ativado, para absorver qualquer resíduo ou toxina residual circulante no trato gastrointestinal. A paciente parece se estabilizar nas 24 horas seguintes e está alerta; entretanto, permanece letárgica e sua pele começa a apresentar uma coloração amarelada. Os exames de sangue mostram glicose sanguínea reduzida, aminotransferase sérica elevada e tempo de protrombina ligeiramente aumentado. Os níveis de amilase e lipase estão normais, indicando não haver qualquer envolvimento do pâncreas, e a análise da urina não indica comprometimento renal. O médico consulta um gastroenterologista que aconselha maior monitoramento da função hepatorrenal e prolongamento do tratamento com fluidos e eletrólitos intravenosos. Após aproximadamente cinco dias, a paciente se recupera. Qual é a base bioquímica da doença dessa mulher?

Comentário. Cerca de 95% de todos as fatalidades causadas por cogumelos na América do Norte estão associadas à ingestão da espécie *Amanita*. Essas espécies produzem uma toxina, a α-amanitina, que se liga a RNAPol II e inibe sua função. As primeiras células a encontrarem a toxinas são as presentes no trato digestivo. Células incapazes de sintetizar novos mRNAs morrem, causando um estresse gastrointestinal agudo. A falência hepática é uma complicação séria da ingestão de α-amanitina. Icterícia e testes da função hepática (fosfatase alcalina, bilirrubina, níveis de aminotransferases e tempo de protrombina) indicam o nível de envolvimento do fígado (Cap. 29). A maioria das exposições acidentais a cogumelos ocorre em crianças com idade inferior a 6 anos que, por causa do tamanho, absorvem uma dose maior de toxina por kg de peso corporal. Em um adulto, a ingestão de um único cogumelo *Amanita phalloides* pode ser fatal. As taxas de mortalidade variam de 10% a 60% de todos os pacientes.

ÁCIDO RIBONUCLEICO MENSAGEIRO: TRANSCRIÇãO

A transcrição é um processo dinâmico que envolve as interações de enzimas e DNA de maneiras específicas para produzir uma molécula de RNA. Para entender melhor este processo, é conveniente dividi-lo em três estágios distintos: iniciação, alongamento e terminação. A transcrição ocorre ao longo da fita antissenso ou molde, produzindo um RNA complementar idêntico à fita senso do DNA (Fig. 32.4), exceto pela substituição de uracila no RNA em lugar de uma timina no DNA.

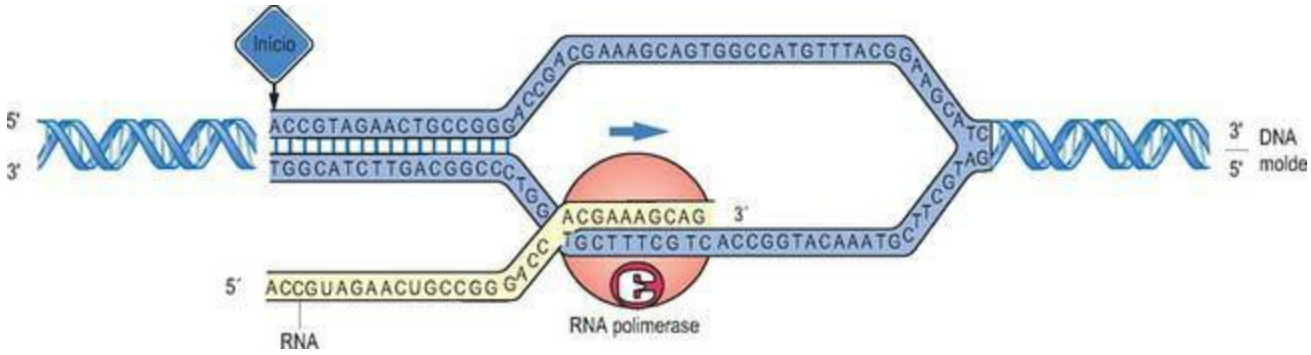


Fig. 32.4 Transcrição. A transcrição envolve a síntese de RNA pela RNA polimerase utilizando DNA como molde. A holoenzima RNA polimerase utiliza a fita antissenso do DNA para direcionar a síntese de uma molécula de RNA que é complementar a essa fita.

Iniciação

A iniciação envolve a interação da RNA polimerase com o DNA de uma maneira específica do sítio. Como a maior parte do DNA genômico não codifica proteínas, a identificação de sítios de início da transcrição é crucial para se obter os mRNAs desejados. Sequências especiais denominadas promotores recrutam a RNA polimerase para o sítio de início da transcrição (Fig. 32.5). Os promotores estão comumente localizados na frente (*acima - upstream*) do gene a ser transcrito. Entretanto, os promotores da RNA polimerase III estão presentes, na verdade, dentro do gene.

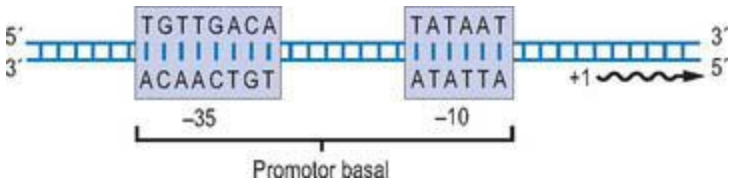


Fig. 32.5 Promotores procarióticos. Os promotores dos genes procarióticos estão localizados imediatamente acima do ponto de início da transcrição. Duas regiões conservadas comuns foram identificadas e são encontradas nas posições –35 e –10, respectivamente. As sequências consenso dessas regiões estão indicadas. A posição +1 indica o primeiro nucleotídeo que será transcrito em RNA. O TATA *box* é um elemento promotor comum rico em AT.

Em geral, os genes procarióticos contêm promotores simples. Estes possuem cerca de 6 a 8 nt de comprimento e estão via de regra localizados logo acima do início da transcrição. Os promotores são usualmente ricos em adenina (A) e timina (T). A presença desses nucleotídeos facilita a separação das duas fitas do DNA, porque as pontes de hidrogênio entre os pares de bases A-T são mais fracas do que entre os pares de bases G-C. As comparações entre inúmeros promotores procarióticos identificaram duas regiões conservadas comuns. Elas estão localizadas a quase 10 e 35 nucleotídeos acima (sequências -10 e –35, respectivamente) do sítio de início da transcrição (Fig. 32.5). A sequência –10 é conhecida como TATA box. Essa sequência se liga ao fator geral de transcrição procariótico (fator σ), que interage e recruta a RNA polimerase para o promotor. Promotores fortes tendem a se assemelhar à sequência consenso mostrada na Figura 32.5; sequências de promotores mais fracos diferem da sequência consenso e a ligação com o fator σ e a RNA polimerase é menos forte.

Nos promotores eucarióticos da RNAPol II (maioria dos genes), elementos regulatórios (pequenas sequencias específicas de DNA), denominados sequências de ativação *upstream* (UASes), acentuadores (*enhancers*), repressores, sequências CAATT e TATA box, estão espalhados por várias centenas a vários milhares de nucleotídeos. Fatores de transcrição individuais (ativadores ou repressores) reconhecem e se ligam a essas UASes. O controle da iniciação e a regulação da expressão gênica se encontram detalhados no capítulo 34.

Alongamento

Após a formação de uma ligação fosfodiéster no complexo do RNA, a RNA polimerase se transloca ao longo da fita de DNA molde. Acredita-se que a RNA polimerase realize esse movimento ao oscilar uma região helicoidal pequena de sua molécula entre as conformações contínuas e curvadas, permitindo que ela avance em cerca de 3 Å (= um passo de nucletotídeo) ao longo da fita antissenso. Após a translocação, um novo nucleotídeo é adicionado. O reconhecimento de ribonucleotídeos individuais envolve um processo de duas etapas. Inicialmente, os ribonucleotídeos são reconhecidos e se ligam em um sítio de entrada. A ligação neste sítio aumenta o tempo de vida de um ribonucleotídeo na vizinhança do sítio ativo. Se o ribonucleotídeo seguinte pareia com a próxima base do molde, ele é transferido para o sítio ativo da polimerase e uma nova ligação fosfodiéster é formada, alongando, desse modo, a fita de RNA e completando o processo cíclico.

Existem vários fatores proteicos que se ligam e estabilizam o complexo competente de alongamento da RNA polimerase. Tais fatores são particularmente importantes nas infecções virais. Os vírus, tais como adenovírus, poxvírus, vírus da estomatite vesicular (VSV) e HIV, produzem proteínas virais que estabilizam o complexo da RNA polimerase, ou diretamente ou pelo recrutamento de fatores do hospedeiro. A proteína TAT do HIV é uma das mais bem-conhecidas dessas proteínas estabilizadoras. Ela se liga a complexos de alongamento da RNAPol II que estão transcrevendo o transcrito do HIV e modifica o estado de fosforilação do domínio C terminal da enzima. Isso aumenta sua atividade, aumentando, assim, a replicação viral.

O alongamento pode ser um processo rápido, ocorrendo a uma taxa de aproximadamente 40 nt por segundo. Para que o alongamento ocorra, o DNA de fita dupla deve ser continuamente desenovelado, de forma que a fita molde esteja acessível à RNA polimerase. As DNAs topoisomerases I e II, enzimas associadas ao complexo de transcrição, movem-se ao longo do molde com a RNA polimerase, separando as fitas de DNA para que elas estejam livres para a síntese de RNA.

Terminação

Ao final da unidade transcricional, as RNA polimerases terminam a síntese de RNA em sítios definidos. Os mecanismos de terminação transcricional são mais bem-entendidos em procariotos do que eucariotos. Em procariotos, a terminação ocorre por meio de dois mecanismos bem-caracterizados, que requerem a formação de alças em grampo na estrutura secundária do RNA (Fig. 32.6). Na terminação '*rho*-**in**dependente', uma alça em grampo é formada logo acima da sequência de 6-8 resíduos de uridina (U) localizada próximo à extremidade 3′ do transcrito. A formação dessa estrutura secundária desloca a RNA polimerase do DNA molde, resultando no término da síntese de RNA. Na terminação '*rho*-dependente', a proteína *rho*, uma helicase dependente de ATP, movimenta-se ao longo do RNA recém-sintetizado, seguindo a RNA polimerase. A estrutura secundária induzida pela alça em grampo estável próximo ao final da unidade transcricional faz com que a RNA polimerase pare, permitindo que a proteína *rho* capture e, então, desloque a RNA polimerase do molde, interrompendo, assim, a transcrição.

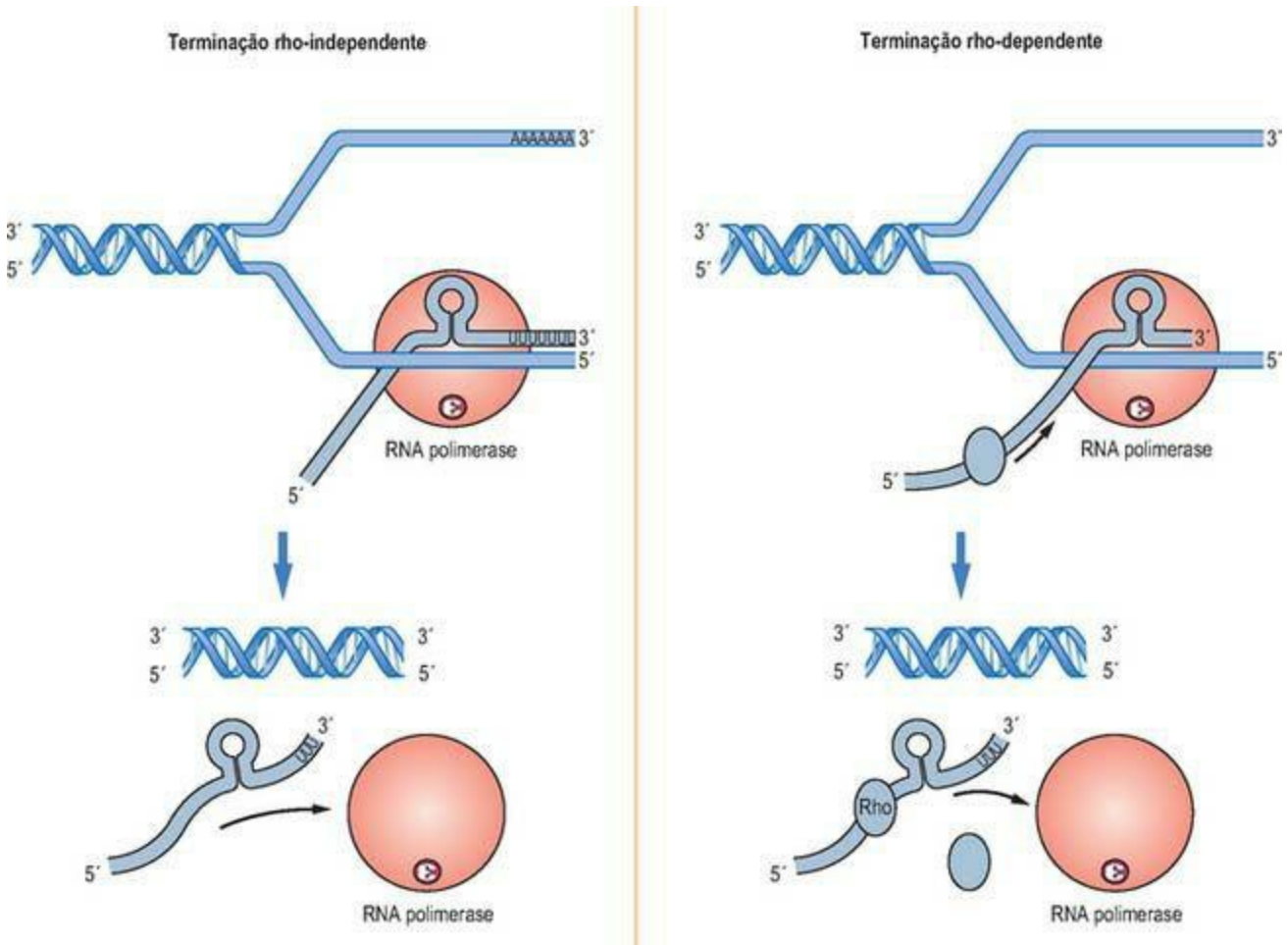


Fig. 32.6 Terminação da transcrição em procariotos. Dois mecanismos de terminação da transcrição em células bacterianas são conhecidos. A terminação rho-independente conta com a formação de uma estrutura secundária no RNA recém-transcrito para expulsar a RNA polimerase do DNA molde e interromper a transcrição. A terminação rho-dependente requer a ação da proteína *rho*. Esta proteína se move ao longo do RNA recém-transcrito, alcançando a RNA polimerase quando ela para no sítio de terminação, causando a dissociação da polimerase do DNA molde.

Em eucariotos, as três RNA polimerases utilizam diferentes mecanismos para terminar a

transcrição. A RNApol I utiliza uma proteína específica, o fator de terminação de transcrito 1 (TTF1), que se liga a um sítio terminador de 18 nt localizado cerca de 1.000 nt abaixo da sequência codificadora do rRNA. Quando a RNAPol I encontra o TTF1 ligado ao DNA, um fator de liberação catalisa a liberação da polimerase do gene do rRNA. A RNAPol III utiliza um mecanismo que é similar à terminação "*rho*-independente" de bactérias; entretanto, o tamanho do trecho de uridina (U) é menor e não há a necessidade de uma estrutura secundária de RNA para deslocar a RNA polimerase. O mecanismo de transcrição pela RNAPol II, que transcreve a maioria dos genes eucarióticos, não é bem compreendido, em parte porque os produtos da RNAPol II são imediatamente processados pela retirada da extremidade 3′ nascente e adição de uma cauda de poliadenosina (poli A).



UM MICRÓBIO TEIMOSO

Um jovem missionário se apresenta na sua clínica. Ele retornou recentemente de um período prolongado de trabalho no exterior. Ele se queixa de febre, perda de peso, fadiga e sudorese noturna. Ele apresenta tosse produtiva. Ao relatar seu histórico médico, ele conta que um médico local o tratou com rifampicina, um poderoso inibidor da RNA polimerase bacteriana, mas sua condição não melhorou. Na verdade, ele reclama que sua condição piorou. No exame físico, você nota que ele apresenta sons de respiração anormais nos lobos superiores dos pulmões. Uma radiografia do peitoral mostra um infiltrado nodular e desigual nos lobos pulmonares superiores. Você suspeita de tuberculose, de forma que solicita um teste de tuberculina e, já que a cultura de micobactérias pode levar semanas, também solicita um teste baseado em PCR (Cap. 35) específico para a anállise do DNA de *M. tuberculosis*. Você leva o rapaz a uma sala de isolamento. No dia seguinte, o teste baseado em PCR dá positivo para *M. tuberculosis* e, após 72 horas, o teste de tuberculina tem como resultado um endurecimento maior do que 10 mm de diâmetro, indicando uma resposta bastante intensa. O paciente lhe pergunta por que os antibióticos não surtiram efeito.

Comentário. Os antibióticos atuam de forma direcionada a funções específicas da célula. A rifampicina é um inibidor muito potente de RNA polimerases procarióticas, mas não para as eucarióticas. Como a rifampicina é um dos antibióticos recomendados para tuberculose, mas a condição do paciente piorou; você suspeita que este rapaz possa apresentar uma forma de tuberculose resistente a antibiótico. As formas resistentes a antibióticos são cada vez mais comuns na tuberculose, assim como em muitas outras doenças bacterianas. Você solicita testes de crescimento dos isolados de micobactérias para determinar se a linhagem é de fato multirresistente a drogas (MDR-TB), e imediatamente inicia com o paciente um protocolo com múltiplas drogas destinado a combater a MDR-TB. Após duas semanas de doses diárias, o paciente pode receber doses duas a três vezes por semana. O tratamento continuado da MDR-TB pode durar de 18 a 24 meses e as consultas devem ser feitas com um profissional especializado em MDR-TB.

PROCESSAMENTO PÓS-TRANSCRICIONAL DE ÁCIDOS RIBONUCLEICOS

A estratégia de vida de procariotos é se replicar o mais rápido possível quando as condições são favoráveis ao crescimento. Os eucariotos possuem uma estratégia de vida mais controlada que investe mais em uma maior regulação para alcançar um crescimento estável, mas limita a reprodução rápida. Ambas as estratégias são adequadas a cada tipo de organismo, tal como evidenciado pela rica diversidade de vida na Terra; mecanismos de síntese de RNA e processamento se desenvolveram para otimizar cada estratégia de vida. Isso é especificamente verdadeiro para os mRNAs.

Pré-rRNA e pré-tRNA

Tanto em procariotos quanto em eucariotos, os tRNAs e rRNAs são sintetizados como moléculas precursoras maiores que devem ser processadas para gerar transcritos maduros (Fig. 32.7). Em procariotos, o transcrito de pré rRNA contém várias características. Um único transcrito de rRNA 30S (quase 6,5 kb) contém regiões específicas líder e *trailer* (reboque) localizadas nas extremidades 5′ e 3′ dos transcritos, bem como uma cópia de cada um dos rRNAs 23S, 16S e 5S. Os genes de rRNA também contêm vários tRNAs que estão inseridos no transcrito do pré rRNA. O transcrito de rRNA deve ser processado para liberar os RNAs funcionais. A inclusão de cada um dos RNAs ribossomais em um único transcrito é claramente vantajosa para manter a razão das subunidades maior e menor dos ribossomos.

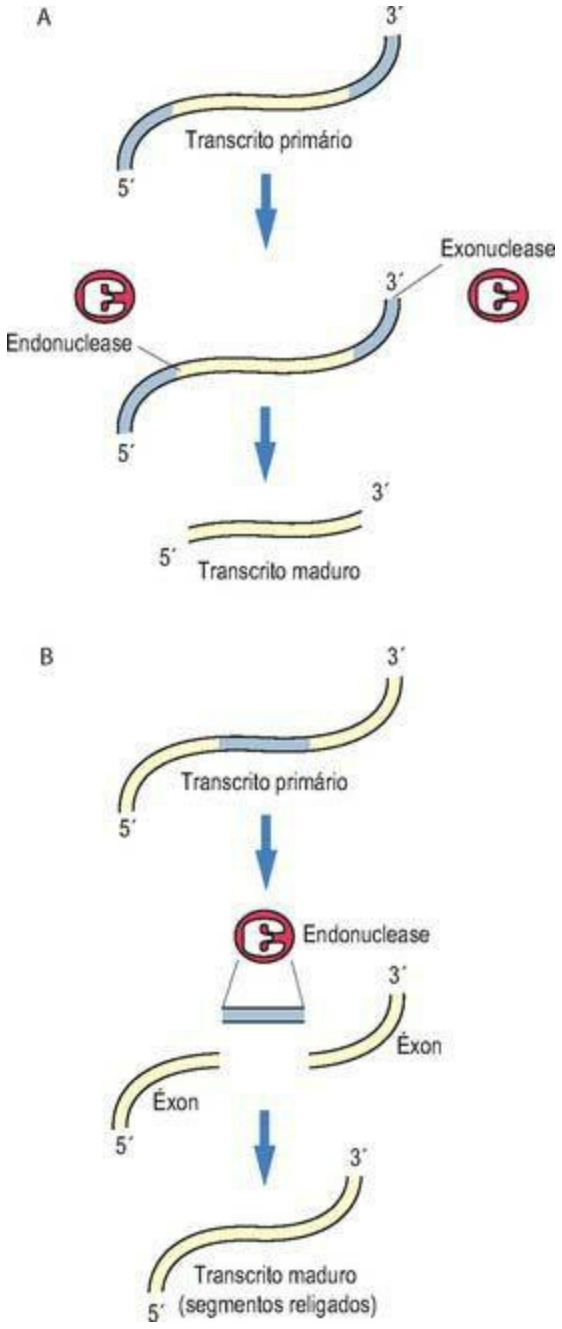


Fig. 32.7 Processamento do RNA. Existem dois tipos gerais de eventos de processamento do RNA. O processamento de um transcrito de RNA pode envolver (A) a remoção do excesso de sequências pela ação de endonucleases e exonucleases, como ocorre no processamento dos genes de rRNA e tRNA, ou (B) a remoção do excesso de sequências e o religação dos segmentos do RNA recém-

sintetizados, como ocorre no *splicing* de mRNAs.

Em procariotos, o processamento de pré-rRNA requer várias RNases. A ribonuclease III (RNase III) cliva o pré-rRNA em regiões de dupla fita. Tais regiões ocorrem em cada extremidade dos rRNAs 16S e 23S, e esta quebra libera estes rRNAs do transcrito de pré-rRNA. Os rRNAs 16S e 23S são posteriormente processados nas extremidades 5′ e 3′; entretanto, esse processamento requer a presença de proteínas ribossomais específicas e ocorre durante a montagem do ribossomo.

Em todos os eucariotos, de leveduras a mamíferos, os transcritos de pré-rRNA são processados de maneira similar ao processamento do pré-rRNA procariótico. Cada transcrito de rRNA 45 (13,7 kb) inclui uma única cópia dos rRNAs 18S, 5,8S e 28S. Entretanto, o processamento do rRNA humano é mais complexo. O transcrito de pré rRNA deve ser clivado em 11 sítios diferentes para gerar os rRNAs 18S, 28S, 5,8S e 5S maduros. O processamento ocorre em um grande complexo de ribonucleoproteínas denominado processomo. Além de modificações por clivagem, o rRNA humano maduro contém 115 modificações de grupamentos metil específicos (na maior parte delas, o grupamento metil é adicionado ao grupamento ribosil 2′-hidroxil do suporte) e 95 conversões específicas de uridina em pseudouridina (ψ). Essas modificações são introduzidas no pré-rRNA pela interação com complexos de ribonucleoproteínas nucleolares pequenas (snoRNPs, pronuncia-se *snorps*). Cada uma dessas snoRNPs contém um único RNA guia (aproximadamente 60-300 nt de comprimento) e entre uma a quatro moléculas de proteínas. Cada snoRNP é específica para um único ou no máximo alguns sítios de modificação individuais. As snoRNAs direcionam a ligação das snoRNPs aos sítios nas moléculas de pré-rRNA por causa de um trecho de nucleotídeos complementares (quase 10-20 nucleotídeos), os quais posicionam corretamente uma metil transferase ou uma pseudouridina sintase na posição para modificar o pré-rRNA. O processomo contém mais do que 100 snoRNAs, assim como mais de 100 proteínas individuais. Estudos sobre o processomo estão em andamento e um quadro claro do processamento do pré-rRNA permanece incompleto.

RIBOZIMAS: RNAS QUE ATUAM COMO ENZIMAS

Em alguns casos, os RNAs possuem atividade catalítica similar a alguns tipos de atividades previamente atribuídas somente a proteínas (isto é, atividade de ribonuclease). Essas moléculas catalíticas incomuns são conhecidas como ribozimas. A especificidade de substrato de uma ribozima é determinada pelo pareamento de bases nucleotídicas entre sequências complementares contidas dentro da enzima e o substrato de RNA que ela cliva. Da mesma maneira que as enzimas proteicas, a ribozima clivará seu substrato de RNA em um sítio específico e, então, o liberará, sem ser consumida pela reação. Alguns vírus de RNA, especialmente vírus de plantas e partículas do tipo vírus, tais como o agente delta ou o vírus da hepatite D (HVD), que utiliza o ciclo de replicação por círculo rolante, conta com a ação de ribozimas para clivar os RNAs virais do produto de pré-RNA.

Como as sequências necessárias à atividade da ribozima foram identificadas, pode-se projetar ribozimas para clivar qualquer RNA. As ribozimas recombinantes estão sendo consideradas como possíveis agentes terapêuticos para doenças causadas por expressão inapropriada de um RNA ou a expressão de um RNA mutado. Teoricamente, com o desenvolvimento de uma ribozima com especificidade para um RNA em particular, espera-se como resultado a degradação seletiva do substrato, eliminando-o da célula e inibindo o processo de doença.

Além dos genes de rRNA, os tRNAs também são sintetizados sob uma forma precursora. Tanto quanto sete tRNAs individuais podem ser sintetizados de um único gene de pré-tRNA. O processamento dos tRNAs de um pré-tRNA requer uma RNase P, que cliva cada tRNA do pré-tRNA por uma única quebra na extremidade 5′. A RNase P é um complexo RNA-proteína contendo um RNA de 377 nucleotídeos e uma proteína de 20 kDa. Uma descoberta notável foi que a porção de RNA deste complexo é suficiente para clivar o RNA, isto é, a porção proteica não é necessária para a atividade enzimática. A descoberta do auto-*splicing* do RNA – quer dizer, RNA com uma atividade enzimática, uma ribozima – levou a novas ideias sobre a evolução celular inicial, a qual originalmente se acreditou ter começado com aminoácidos e proteínas. Acredita-se agora que ribonucleotídeos e RNA devam ter sido os biopolímeros catalíticos mais primitivos a terem se formado na Terra, fornecendo diversidade genética, e que DNA e proteínas devam ter surgido posteriormente. Uma terceira enzima, a RNase D, apara os nucleotídeos extras da extremidade 3′ dos pré-tRNAs, deixando o CCA invariável encontrado na extremidade 3′ de cada tRNA.

Processamento do pré-mRNA

Os procariotos são capazes de alterar rapidamente a síntese de RNA para a produção imediata de uma proteína. Após atender suas necessidades imediatas, eles subsequentemente degradam seus mRNAs e reutilizam os ribonucleotídeos. A meia-vida típica de um mRNA procariótico é de cerca de três minutos. Por sua vez, os eucariotos tomam precauções especiais para manter seus mRNAs estáveis para seu uso continuado. As meia-vidas de mRNAs eucarióticos variam de poucos minutos, para alguns fatores de transcrição fortemente regulados, a até 30 horas para alguns transcritos de vida longa. Os procariotos rapidamente sintetizam seus mRNAs e tipicamente não os processam ou os modificam: ambas as extremidades 5′ e 3′ de mRNAs procarióticos são descobertas e desprotegidas. Consequentemente, mesmo mRNAs recém-sintetizados são rapidamente degradados por RNases celulares normais. Isto não é um problema para esses organismos que crescem rapidamente.

Como eucariotos mantêm seus transcritos para uso prolongado, estes organismos desenvolveram métodos para proteger cada extremidade do mRNA. Na extremidade 5′, uma única estrutura denominada ‘cap 5′’ é adicionada. Este cap consiste em um resíduo de 7-metilguanidina ligado em orientação inversa ao primeiro nucleotídeo do mRNA, isto é, por uma ligação 5′ ao 5′ trifosfato (m^7Gppp). A maioria das exo-RNases celulares não é capaz de hidrolisar este cap do mRNA, de forma que a extremidade 5′ está imune a sua presença. Na extremidade 3′ de todos os mRNAs eucarióticos (com exceção dos mRNAs de histonas), uma marca de poliadenosina é adicionada, denominada cauda poli A. Os resíduos de adenosina não são codificados pelo DNA, mas ao invés disso são adicionados pela ação da poli(A) polimerase utilizando ATP como substrato. Essa cauda poli A frequentemente tem um comprimento > 250 nucleotídeos. Embora ainda seja suscetível à ação de exo-RNases, a presença dessa cauda aumenta significativamente o tempo de vida do mRNA. A presença da cauda poli A tem sido historicamente usada para isolar o mRNA de células eucarióticas.

Nos processamentos pós-transcricionais mais complicados de mRNAs eucarióticos, sequências denominadas íntrons (sequências intervenientes) são removidas do transcrito primário e os segmentos remanescentes, denominados éxons (sequências expressas), são ligados para formar um RNA funcional. Este processo envolve um complexo grande de proteínas e RNAs auxiliares chamados pequenos RNAs nucleares (snRNAs), os quais interagem para formar um *spliceossomo*. A função dos cinco snRNAs (U1, U2, U4, U5 e U6) no *spliceossomo* é ajudar a posicionar os grupamentos reativos dentro do substrato, a molécula de RNA, de modo que os íntrons possam ser removidos e os éxons apropriados possam ser rearranjados corretamente (Tabela 32.3). Os snRNAs realizam esta tarefa se ligando, por meio de interações de pareamento de bases, com os sítios no mRNA que representam os limites íntron/éxon. Os fatores proteicos que acompanham o complexo são responsáveis por manter a união dos componentes reacionais para facilitar a reação.

Tabela 32.3 A função de pequenos RNAs nucleares (snRNAs) no splicing de mRNAs.

snRNAs e suas funções no *splicing* de mRNAs		
snRNA	**Tamanho**	**Função**
U1	165nt	Liga-seao limite 5′ éxon/íntron
U2	185nt	Liga-se ao sitio de ramificação no íntron
U4	145nt	Ajuda a montar o *spliceossomo*
U5	116nt	Liga-seao limite 3′ íntron/éxon
U6	106nt	Desloca U1 apóso primeiro rearranjo

Pode-se considerar que a remoção de um íntron e a religação de dois éxons ocorrem em duas etapas (Fig. 32.8). A primeira etapa envolve a quebra da ligação fosfodiéster no limite íntron/éxon na extremidade 5′ do íntron. Isto é efetuado por uma reação de transesterificação, a qual ocorre entre a 2′-OH de um nucleotídeo de adenosina, usualmente encontrada cerca de 30 nt da extremidade 3′ do íntron, e o fosfato da ligação fosfodiéster de um resíduo de guanosina localizado na extremidade 5′ do íntron. Essa reação cliva a cadeia nucleotídica e produz uma estrutura ramificada na extremidade 3′, na qual a adenina possui grupamentos fosfato nos carbonos 2′, 3′ e 5′. O íntron forma uma estrutura curvada semelhante a um laço de vaqueiro. A segunda etapa da reação envolve a clivagem da ligação fosfodiéster na extremidade 3′ do íntron, que libera a estrutura em forma de laço do complexo. O *splicing* é completado pela junção da extremidade 3′ de um éxon com a extremidade 5′ do próximo éxon, pela formação de uma ligação fosfodiéster 5′-3′ normal. Tipicamente, a extremidade 3′ de um éxon será rearranjada à extremidade 5′ do éxon mais próximo, produzindo um transcrito que exibe todos os éxons na ordem que foram transcritos.

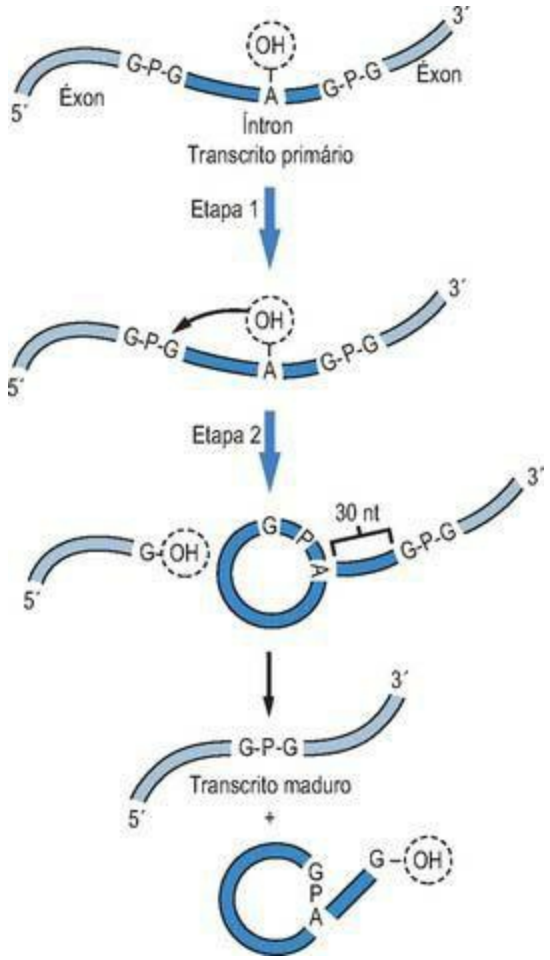


Fig. 32.8 ***Splicing*** **do RNA.** O *splicing* do RNA é um processo com várias etapas catalisado por complexos de ribonucleoproteínas, e se encontra simplificado no diagrama acima. Em uma reação de transesterificação, a ligação fosfato de um resíduo de guanosina no limite 5′ do éxon/íntron é quebrada e ligada ao 2′-OH de um resíduo de adenina localizado no meio do íntron. Em uma etapa posterior, a ligação fosfato no limite 3′ do íntron/éxon é primeiro clivada e, então, os dois éxons são unidos pela formação de uma nova ligação fosfodiéster entre os nucleotídeos em ambas as extremidades dos éxons. O íntron é eliminado sob a forma de uma estrutura de laço, tornada cíclica por um resíduo de adenosina fosforilado nos carbonos 2′, 3′ e 5′.

IMPRINTING GENÔMICO

Os snoRNAs também atuam no *imprinting* genômico. O *imprinting* genômico é um processo epigenético (quadro da pág. 455) que resulta em expressão diferencial dos genes de origem materna e paterna no desenvolvimento do embrião. Este processo ocorre tanto em mamíferos quanto em plantas. Genes específicos são metilados durante a meiose e, portanto, inativados. Essa metilação ocorre diferencialmente no desenvolvimento do ovócito e do espermatócito, inativando, assim, unicamente tanto os alelos maternos quanto os paternos durante o desenvolvimento embrionário. O *imprinting* genômico pode afetar um grande número de condições em humanos, incluindo a suscetibilidade à asma, ao câncer, ao diabetes, à obesidade e a inúmeras desordens do desenvolvimento. Pelo menos 83 genes são conhecidos por terem esta característica em humanos, ou seja, são metilados e inativados em um dos genes parentais.

A maioria dos mRNAs eucarióticos consiste em múltiplos íntrons e múltiplos éxons. Se o *splicing* fosse realizado corretamente, somente um único mRNA maduro resultaria dos pré-mRNAs. Entretanto, muitos genes eucarióticos sofrem um processo chamado *splicing* alternativo, no qual

diferentes éxons são recombinados para formar múltiplos mRNAs maduros (Fig. 32.3). Quando esses mRNAs diferentes são traduzidos, múltiplas isoformas de proteínas são formadas. Em seres humanos, quase 60% dos pré-mRNAs originam múltiplos mRNAs maduros seguindo o *splicing* alternativo. Cerca de 80% desses mRNAs que sofrem o *splicing* alternativo resultam em variações das proteínas codificadas (alguns eventos de *splicing* ocorrem nas regiões 5′ e 3′ não traduzidas). O *splicing* alternativo pode resultar em inserção ou deleção de aminoácidos na sequência da proteína, mudanças de fases de leitura ou mesmo a introdução de novos códons de parada. Ele também pode adicionar ou remover sequências de mRNA capazes de alterar elementos regulatórios, afetando tradução, estabilidade do mRNA ou localização subcelular. Em vertebrados (camundongos, humanos e peixes), os íntrons de muitos genes de proteínas ribossomais contêm as sequências dos pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs) que atuam na modificação de resíduos específicos nos rRNAs e tRNAs; entretanto, muitos íntrons não contêm essas sequências e sua função permanece obscura.

Finalmente, em certos casos, os mRNAs são editados após a transcrição por meio de um dentre vários mecanismos diferentes. Estes incluem modificações específicas de C para U, causadas por citosinas desaminases, ou modificações de A para I, causadas por adenosinas desaminases, ou deleções simples ou múltiplas de resíduos U para alterar a sequência de nucleotídeos do mRNA. Essas alterações levam a diferenças nos códons, resultando em sequências alteradas das proteínas que diferem da sequência codificada no nível de gene (Cap. 34). Um complexo multiproteico grande denominado editossomo está envolvido nesse processo. Os snoRNAs que atuam na modificação de rRNA e de tRNA também atuam nesses processos de edição de RNA. Esses snoRNAs se ligam aos sítios de edição dentro dos mRNAs e posiciona o editossomo com a atividade de citosina desaminase ou adenosina desaminase na posição correta para completar a modificação.

O RNAi COMO UMA OPÇÃO TERAPÊUTICA

A degeneração macular relacionada à idade (AMD) é a principal causa de cegueira entre os idosos nos países desenvolvidos. A AMD resulta de uma atrofia da mácula, na retina. O resultado da atrofia é a perda da visão central, que pode levar à incapacidade de ler ou mesmo reconhecer rostos. O tipo mais grave de AMD (a forma úmida) causa perda de visão devido ao crescimento de vasos sanguíneos (neovascularização) nos capilares da retina que, se não for tratado, leva a um extravasamento de sangue e proteína sob a mácula. Isto por fim causa uma cicatriz e dano irreversível aos fotorreceptores.

Um mecanismo que causa neovascularização é a expressão anormal na retina do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é pró-angiogênico, o qual resulta em desenvolvimento dos vasos sanguíneos. Um dos tratamentos propostos é o uso de anticorpos anti-VEGF (ranibizumabe (Lucentis®) ou bevacizumabe (Avastin®)) injetados diretamente no humor vítreo do olho. Esses anticorpos se ligam ao VEGF, inativando-o e, dessa forma, reduz o nível de angiogênese e prolonga a visão. A capacidade de uma célula de regular negativamente os níveis de mRNA específico acoplada à área de tratamento localizado oferecida pelo humor vítreo torna o gene do VEGF um candidato ideal para a regulação negativa mediada por RNAi. Pequenas moléculas de RNA complementares ao mRNA do VEGF são injetadas no vítreo. Quando essas moléculas são internalizadas pelas células funcionam como siRNAs, causando degradação do mRNA do VEGF e diminuindo a biossíntese de VEGF. Vários ensaios clínicos estão em desenvolvimento para avaliar o uso de RNAi como método

terapêutico para o tratamento da AMD. Uma abordagem similar deve também funcionar para o tratamento da retinopatia diabética. Em 2009, estava prevista a aprovação pela FDA de drogas baseadas em RNAi para o tratamento de AMD. Outros ensaios com RNAi estão atualmente em andamento para o vírus respiratório sincicial (RSV), hepatite C, doença de Huntington, HIV e câncer.

DEGRADAÇãO OU INATIVAÇãO SELETIVA DO ÁCIDO RIBONUCLEICO

Os vírus de RNA representam um importante desafio para as células eucarióticas; entretanto, os mecanismos naturais de defesa evoluíram para limitar a infecção viral. Os vírus de RNA geralmente formam uma dupla fita (ds) replicativa intermediária durante o seu ciclo de vida, e esse dsRNA é uma estrutura única não comumente encontrada em células eucarióticas. Ele pode ser reconhecido por proteínas que se ligam a dsRNA, desencadeando, em seguida, respostas para limitar a infecção viral. Um desses mecanismos envolve a proteína quinase ativada por dsRNA (PKR). Quando ativada pela ligação do dsRNA, essa enzima pode fosforilar e inativar o fator de tradução de proteína, eIF2α, diminuindo, assim, a tradução de RNA viral. Do mesmo modo, quando ativada pelo dsRNA, a enzima 2′-5′ oligoadenilato sintase (2-5A sintase) polimeriza ATP em uma série de pequenos nucleotídeos (2′-5′oligoadenilato, 2-5A), que difere da estrutura 5′-3′ encontrada no RNA normal. A forma mais ativa é o trímero pppA-2′-p-5′′-A-2′-p-5′-A. O acúmulo de 2-5A inibe a tradução de proteínas virais (e do hospedeiro) pela ativação de uma endorribonuclease (RNase L) que degrada indiscriminadamente tanto os mRNAs quanto os rRNAs dentro da célula. Ambos os genes, PKR e 2-5A sintase, são induzidos por interferon, que é regulado positivamente pela infecção viral. Isto resulta em um mecanismo de amplificação eficiente, levando à morte celular programada (apoptose) para limitar o crescimento e disseminação do vírus.

Outro processo importante da imunidade celular inata envolve marcar de forma específica sequências de RNA para rápida degradação. Esse processo é chamado RNA de interferência (RNAi) (Cap. 34) e é, algumas vezes, denominado silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS). Enquanto se acredita que este processo tenha evoluído como uma defesa contra os vírus de RNA de fita dupla, ele também atua como um mecanismo endógeno de regulação gênica durante o desenvolvimento de muitos eucariotos. O PTGS começa quando um RNA duplex é reconhecido dentro das células pela enzima Dicer. A Dicer é uma endonuclease com atividade contra dsRNAs. Quando esta enzima encontra um dsRNA, ela se liga ao RNA duplex (a sequência não é importante), clivando-o em fragmentos dupla fita de 21 a 25 nucleotídeos, denominados pequenos RNAs de interferência (siRNAs). Dependendo do tamanho do RNA de fita dupla, um ou mais siRNAs são formados. Esses pequenos fragmentos, então, encontram um complexo multiproteico chamado RISC. O RISC é composto de inúmeros componentes, incluindo a enzima Argonauta. Esta se liga a pequenos fragmentos, desenrolando-os, e mantém uma das fitas (a fita guia) para agir como um cofator que tem o RNA como alvo; a outra fita é degradada. Por causa do siRNA incorporado, o complexo RISC é capaz de monitorar RNAs dentro da célula e identificar sequências complementares aos siRNAs. Quando o complexo RISC identifica uma sequência de RNA complementar, ele fará um par de bases com este e o clivará. Como as extremidades do RNA são desprotegidas e rapidamente degradadas via RNAses endógenas (lembre-se da importância de um cap 5′ e uma cauda poli A 3′ em mRNAs eucarióticos), o resultado dessa clivagem é o início da rápida degradação dos RNAs que são complementares aos siRNAs e, portanto, a eliminação do RNA viral.

Resumo

Os principais produtos da transcrição são os rRNAs, tRNAs e mRNAs. Estes RNAs desempenham funções específicas no interior da célula. Os mRNAs carregam a informação genética do DNA nuclear para os ribossomos para a síntese de proteínas. Os rRNAs interagem com proteínas para formar os ribossomos, a maquinaria celular básica na qual ocorre a síntese de proteínas. Os tRNAs atuam com carreadores de aminoácidos que traduzem a informação armazenada na sequência de nucleotídeos do mRNA para a sequência de aminoácidos das proteínas. Nas células eucarióticas, cada uma dessas classes de RNA é produzida por uma RNA polimerase diferente e específica (RNA pol II, I e III, respectivamente), enquanto nas células bacterianas uma única RNA polimerase sintetiza as três classes de RNA. As estruturas básicas dos rRNAs e tRNAs de células eucarióticas e bacterianas são semelhantes. Entretanto, os mRNAs de células eucarióticas possuem um cap (m^7Gppp) 5′ e uma cauda ($[A]_n$) 3′. Os mRNAs procarióticos não apresentam essas modificações em suas extremidades 5′ e 3′ e podem ser policistrônicos. Além disso, a maioria dos mRNAs eucarióticos deve sofrer um processo chamado *splicing* para se tornar funcional, enquanto mRNAs procarióticos são funcionais assim que são sintetizados. O *splicing* envolve a remoção de sequências denominadas íntrons e a religação das sequências de éxons umas com as outras para formar um mRNA maduro e funcional. O processo de transcrição consiste em três etapas: iniciação, alongamento e terminação. A iniciação envolve o reconhecimento e a ligação de sequências promotoras pela RNA polimerase e cofatores transcricionais associados. O alongamento envolve a seleção do nucleotídeo apropriado e a formação das pontes fosfodiéster entre cada nucleotídeo de uma molécula de RNA. Finalmente, a terminação envolve a dissociação da RNA polimerase do DNA molde. Isto é mediado pela estrutura secundária do RNA ou por fatores proteicos específicos. Mecanismos celulares singulares reconhecem o RNA de fita dupla e limitam a infecção viral por vários mecanismos, alguns induzem a degradação do mRNA total e outros marcam mRNAs específicos para degradação.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Que antibióticos comumente usados são direcionados para a inibição de RNA polimerase bacteriana, mas não afetam o complexo de mamíferos? Por que essas drogas são menos eficazes contra infecções de fungos?

2. Reveja a patogênese do lúpus eritematoso sistêmico, uma doença autoimune na qual anticorpos contra partículas ribonucleoproteicas estão associados ao desenvolvimento de inflamação crônica.

3. Reveja a patogênese das talassemias, com ênfase nas variantes cujas mutações gênicas afetam a síntese, o processamento e o *splicing* do RNA da hemoglobina levando à anemia.

Leituras sugeridas

Akusjarvi G, Stevenin J. *Remodeling of the host cell RNA splicing machinery during an adenovirus infection*. 2003;272:253-286.

Eisenberg I, Eran A, Nishino I, et al. *Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders*. 2007;104:17016-17021.

Herman T, Westhof E. *RNA as a drug target: chemical, modeling, and evolutionary tools*. 1998;9:66-73.

Jarad G, Simske JS, Sedor JR, Schelling JR. *Nucleic acid-based techniques for post-transcriptional regulation of molecular targets*. 2003;12:415-421.

Jirtle RL, Weidman JR. *Imprinted and more equal*. 2007;95:143-149.

Khan AU, Lal SK. *Ribozymes: a modern tool in medicine*. 2003;10:457-467.

Raj SM, Liu F. *Engineering of RNase P ribozyme for gene-targeting applications*. 2003;313:59-69.

Sassone-Corsi P. *Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis*. 2002;296:2176-2178.

G-S Wang, TA Cooper. *Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery*. 2007;8:749-761.

Sites

RNA polimerase RNA polimerase. www.rcsb.org/pdb/molecules/pdb40_1.html.

Spliceossomo *Spliceossomo*:

- www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/pathol/spliceosome.htm
- en.wikipedia.org/wiki/Spliceosome

Ribozima Ribozima. www.ribozyme.no/highveld.com/pages/ribozyme.html.

Talassemia Talassemia. www.cooleysanemia.org/; www.vgvh.org/tha/whatisit.htm

Transcrição Transcrição em eucariotos. nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2006/chemadv06.pdf.

RNAi RNAi:

- www.pbs.org/wgbh/nova/sciencenow/3210/02-cure.html
- nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/index.html

Síntese e Reciclagem de Proteínas

J.R. Patton

G.A. Bannon

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever como os vários RNAs envolvidos na síntese proteica interagem para produzir um polipeptídeo.
- Identificar a estrutura e redundância do código genético.
- Explicar como as proteínas são direcionadas para organelas subcelulares específicas.
- Descrever as etapas principais na síntese e degradação de uma proteína citosólica.

INTRODUÇÃO

A síntese de proteínas ou tradução representa o ápice da transferência de informação genética, armazenada como bases nucleotídicas no ácido desoxirribonucleico (DNA), para moléculas de proteína que são os principais componentes estruturais e funcionais das células vivas. É durante a tradução que essa informação, expressa como uma sequência específica de nucleotídeos em uma molécula de ácido ribonucleico (RNA) é usada para direcionar a síntese de uma proteína. A proteína então se dobra em uma estrutura tridimensional que é determinada, em grande parte, pela sua sequência e aminoácidos. Para traduzir um mRNA em proteína, três componentes básicos de RNA são necessários:

- ribossomos, contendo RNA ribossomal (rRNA),
- RNA mensageiro (mRNA),
- RNA de transferência (tRNA).

O ribossomo, composto de rRNAs e diversas proteínas, é uma máquina macromolecular na qual ocorre toda a síntese proteica. A informação necessária para dirigir a síntese da sequência primária da proteína está contida no mRNA. Os aminoácidos que serão incorporados na proteína estão acoplados aos tRNAs. O ribossomo interage com as moléculas de tRNA e mRNA para que o aminoácido certo seja incorporado na proteína. A tradução do mRNA se inicia próxima a extremidade 5′ da fita molde e segue em direção à extremidade 3′, e as proteínas são sintetizadas de sua porção aminoterminal. Portanto, a extremidade 5′ do RNA codifica a porção aminoterminal da proteína e a extremidade 3′ do RNA codifica a porção carboxiterminal da proteína.

Este capítulo começa com uma introdução ao código genético e os componentes necessários para a síntese proteica. Em seguida temos a apresentação da estrutura e função do ribossomo, detalhando o processo de tradução descrevendo a iniciação, alongamento e terminação da síntese proteica e os mecanismos pelos quais as proteínas são direcionadas para locais específicos na célula. Mais à frente discutem-se as modificações pós-transcricionais das proteínas e o capítulo termina com a descrição do papel de um segundo complexo macromolecular, o proteassoma, na reciclagem de proteínas.

O CÓDIGO GENÉTICO

O código é degenerado e não é totalmente universal

O mRNA que será utilizado na tradução possui somente quatro nucleotídeos: adenosina, A; citosina, C; guanina, G; e uracila, U, mas codificará uma proteína contendo até 20 aminoácidos diferentes. Portanto não há uma correlação de um para um entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos; ao invés disso, séries de três nucleotídeos no mRNA, conhecidas como códons, são necessárias para especificar cada aminoácido. Quando se leva em conta todas as combinações dos quatro nucleotídeos sendo três de cada vez, se obtém 64 códons possíveis (Tabela 33.1). Três desses códons (UAA, UAG, UGA) são usados como sinal para cessar a síntese de uma proteína e não especificam nenhum aminoácido. Os outros especificam os 20 aminoácidos, o que ilustra uma característica do código genético conhecida como degeneração: mais de um códon pode especificar um aminoácido específico. Por exemplo, os códons GUU, GUC, GUA e GUG codificam para o aminoácido valina. De fato, todos os aminoácidos, com exceção da metionina (AUG) e do triptofano (UGG), possuem mais de um códon. O códon AUG, que especifica somente a metionina, codifica a metionina sempre que aparece no RNA e também marca o ponto de partida para a síntese proteica.

Tabela 33.1 O código genético. O código genético é degenerado, o que significa que mais de um códon pode codificar um aminoácido e em mui-tos casos, alterar o nudeotídeo na terceira posição não altera o aminoácido codificado. Para encontrar a(s) sequência(s) de códons que codifica(m) um aminoácido em particular, só é preciso encontrar o aminoácido na tabela e combinar a sequência de nucleotídeos para cada posição. Por exemplo, a metionina (Met) é codificada pela sequência AUG. Para encontrar o amino-ácido que corresponde a sequência do códon é só inverter o processo

1ª posição	2ª posição				3ª posição
	G	A	C	U	
G	Gly	Glu	Ala	Val	G
	Gly	Glu	Ala	Val	A
	Gly	Asp	Ala	Val	C
	Gly	Asp	Ala	Val	U
A	Arg	Lys	Thr	Met	G
	Arg	Lys	Thr	Ile	A
	Ser	Asn	Thr	Ile	C
	Ser	Asn	Thr	Ile	U
C	Arg	Gln	Pro	Leu	G
	Arg	Gln	Pro	Leu	A
	Arg	His	Pro	Leu	C
	Arg	His	Pro	Leu	U
U	Trp	Término	Ser	Leu	G
	Término	Término	Ser	Leu	A
	Cys	Tyr	Ser	Phe	C
	Cys	Tyr	Ser	Phe	U

O código genético especificado pela trinca de nucleotídeos é, em grande parte, o mesmo para

bactérias e humanos e é classificado como "universal". No entanto, existem exceções e alguns exemplos são encontrados em bactérias e mitocôndrias. Em bactérias, se os códons GUG e UUG aparecerem no início da síntese proteica, podem ser lidos como o códon para metionina. Existem também pequenas diferenças no código genético de mitocôndrias; por exemplo, nas mitocôndrias de vertebrados existem códons adicionais que podem codificar a metionina, UGA que normalmente é um códon de término, codifica o triptofano e existem códons de término adicionais.

ANEMIA FALCIFORME: UMA MUTAÇÃO DO CÓDIGO GENÉTICO

A anemia falciforme é um exemplo de uma doença na qual a mudança de um único nucleotídeo na região codificante do gene para a cadeia β da hemoglobina A, a forma principal de hemoglobina no adulto, produz uma proteína alterada e com a função comprometida (Cap. 5). A mutação que causa essa doença é uma mudança em um único nucleotídeo em um códon que normalmente codifica o glutamato (GAG) e que passa a produzir um códon que especifica a valina (GUG). Em condições de baixa tensão de oxigênio, essa única troca de aminoácidos faz com que a proteína se polimerize em estruturas com forma de bastão, resultando na deformação das hemácias na alteração da fluidez dessas células nos vasos e capilares. Quando a hemoglobina não está ligada ao oxigênio, a conformação da proteína expõe uma porção hidrofóbica, permitindo que as proteínas mutantes com valina interajam mais facilmente e formem bastões. A substituição de um aminoácido com uma cadeia lateral ácida por um aminoácido com uma cadeia lateral apolar e hidrofóbica é denominada uma mutação não conservadora. Mutações conservativas de um aminoácido por outro com propriedades físicas e químicas similares podem ter consequências menos graves, por exemplo uma mutação Arg → Lys ou Asp → Glu.

Outro aspecto do código genético é que uma vez iniciada a síntese em um códon AUG para metionina, cada trinca daquele ponto será lida sem interrupções até que se encontre um códon de término. Assim o "quadro de leitura" do mRNA será ditado pelo códon de iniciação. Mutações que levem à adição ou deleção de um único nucleotídeo causam uma modificação no quadro de leitura, resultando em uma proteína com uma sequência de aminoácidos diferente (sem sentido) após a mutação ou a uma proteína terminada prematuramente se um códon de término surgir no quadro (Tabela 33.2).

Tabela 33.2 O efeito de mutações em urna única base. Mutações em um gene são transcritas para o mRNA e as mudanças resultantes na se-quência da proteína estão ilustradas. Note que, dependendo da posição da mutação, substituições de um único nudeotídeo podem resultar em mudanças silenciosas, uma troca de um único aminoácido (sentido trocado) ou até o término prematuro (sem sentido)

Descrição da mudança na sequência genética	Sequência do mRNA	Sequência da proteína	Resultado da mudança
Gene normal	AUG GGG AAU CUA UCA CCU GAU...	Met-Gly-Asn-Leu-Ser-Pro-Asp-...	Proteína normal
Inserção	AUG GG**C** GAA UCU AUC ACC UGA U...	Met-Gly-Glu-Ser-Ile-Thr-Término	Término prematuro
Deleção	AUG GGG AAU CUA UC C CUG AUC...	Met-Gly-Asn-Leu-Ser-Leu-Ile-...	Sequência diferente
Deleção	AUG GGA A UC UAA UAC CUG AUC...	Met-Gly-Ile-Término	Término prematuro
Substituição	AUG GGG AAU CUA **CG**A CCU GAU...	Met-Gly-Asn-Leu-Arg-Pro-Asp-...	Substituição
Substituição	AUG GGG AAU CUG UCA CCU GAU...	Met-Gly-Asn-Leu-Ser-Pro-Asp-...	Nenhuma mudança (silenciosa)
Substituição	AUG GGG AAU CUA U**G**A CCU GAU...	Met-Gly-Asn-Leu-Término	Término prematuro

A MAQUINARIA DE SÍNTESE PROTEICA

Ribossomos, as máquinas moleculares que conduzem a síntese proteica, consistem em uma subunidade pequena e uma grande que, quando associadas uma à outra, possuem três sítios específicos onde se ligam os tRNAs. Esses sítios são conhecidos como aminoacil-tRNA ou sítio A, peptidil-tRNA ou sítio P e sítio de saída ou sítio E. O sítio A é onde a molécula de tRNA doadora, carregando o aminoácido apropriado em sua haste aceptora, é posicionada antes daquele aminoácido ser incorporado na proteína. O sítio P é o local no ribossomo que contém a molécula de tRNA com o polipeptídeo aminoterminal da proteína recém-sintetizada ainda acoplado à sua haste aceptora. É dentro desses sítios que ocorre o processo de formação das ligações peptídicas. Esse processo é catalisado por uma atividade de peptidil transferase, a qual forma as ligações peptídicas entre o grupamento amino do aminoácido no sítio A e terminal carboxila do peptídeo em formação acoplado ao tRNA no sítio P. O sítio E é para onde o tRNA desacilado se desloca uma vez que a ligação peptídica é formada e vai sair em breve do ribossomo. O sítio E, que fornece um terceiro sítio de interação entre o tRNA e o mRNA nos ribossomos, parece ser essencial para manter o quadro de leitura e assegurar a fidelidade da tradução.

- Sítio A – tRNA doador-aminoácido
- Sítio P – tRNA-cadeia peptídica em crescimento
- Sítio E – sítio ocupado pelo tRNA do tRNA doador-aminoácido anterior

Cada aminoácido tem uma sintetase específica que o acopla a todos os tRNAs que o codificam

Existe uma molécula de tRNA distinta para a maioria dos códons representadas na Tabela 33.1. O aminoácido é acoplado à haste aceptora do tRNA por uma enzima chamada de aminoacil-tRNA sintetase. Essa enzima catalisa a formação de uma ligação éster entre o grupamento hidroxila 3′ do nucleotídeo adenosina ao grupamento carboxila do aminoácido (Fig. 33.1). O acoplamento de um aminoácido ao tRNA é uma reação em dois estágios. Primeiro o grupamento carboxila do aminoácido é ativado por uma reação com a adenosina trifosfato (ATP) para formar um intermediário aminoaciladenilato, o qual se liga ao complexo da sintetase. A enzimologia da ativação do grupamento carboxila dos aminoácidos é similar à da ativação de ácidos graxos pela tiocinase (Cap. 16), mas ao invés de transferir o grupamento acil para o grupamento tiol da coenzima A, o grupamento aminoacil é transferido para o grupamento hidroxila 3′ do tRNA. O produto é descrito como uma molécula de tRNA carregada. Nesse estágio ele está pronto para se ligar ao sítio A do ribossomo, onde ele vai contribuir com seu aminoácido para uma cadeia peptídica em crescimento. Existe uma sintetase específica para cada um dos 20 aminoácidos em proteínas. Essa sintetase acopla o aminoácido apropriado a todos os tRNAs que se liguem à quele aminoácido.

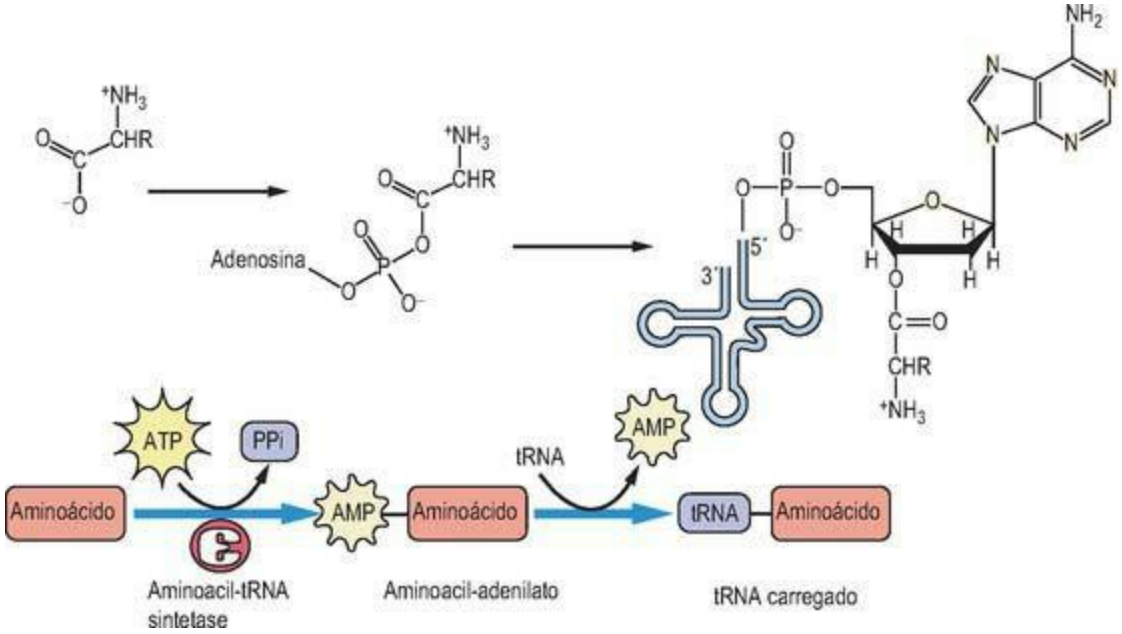


Fig. 33.1 Ativação de um aminoácido e acoplamento ao seu tRNA cognato. O aminoácido deve ser ativado por uma aminoacil-tRNA sintetase para formar um intermediário aminoacil-adenilato, antes que ele seja acoplado à extremidade 3′ do tRNA. AMP, adenosina monofosfato; PPi, pirofosfato inorgânico.

FIDELIDADE DA TRADUÇÃO

AMINOACIL-tRNA SINTETASES TÊM HABILIDADE DE VERIFICAR ERROS

Para garantir a precisão da síntese proteica, houve uma evolução de mecanismos que assegurem a seleção do aminoácido correto para a acilação e de edição de erros de tRNAs já carregados. Um desses mecanismos é encontrado nas enzimas responsáveis pelo acoplamento de um aminoácido ao tRNA correto. As aminoacil-tRNA sintetases tem a capacidade de não só discriminar entre aminoácidos antes que eles sejam acoplados ao tRNA apropriado, mas também de remover aminoácidos acoplados ao tRNA errado. Além disso, essas enzimas devem discriminar entre uma diversidade de tRNAs e serem capazes de parear o tRNA correto com o amino-ácido apropriado. Essas capacidades apresentadas pelas sintetases são realizadas por uma série de ligações de hidrogênio entre a enzima e o aminoácido e entre a enzima e o tRNA. Esses mecanismos se combinam para assegurar a transferência acurada da informação do mRNA para a proteína.

Existe certa flexibilidade no pareamento da posição 3' do códon de mRNA

A interação do tRNA carregado com seu códon relacionado é efetuada pela associação da alça de anticódon no tRNA ao códon no mRNA pela ligação de hidrogênio entre os pares de bases complementares (Fig. 33.2). As regras do pareamento de bases são as mesmas daquelas para o DNA (Cap. 31), exceto na terceira posição, ou base 3′, do códon. Nessa posição, pares de base não usuais podem se formar entre esse nucleotídeo e o primeiro, ou base 5′, do anticódon. A chamada hipótese da oscilação do pareamento códon – anticódon permite a um tRNA que possui um anticódon que não é perfeitamente complementar ao códon de mRNA reconhecer a sequência e permite a incorporação de aminoácidos na cadeia peptídica em crescimento. Assim, se um resíduo de guanina está na posição 5′ do anticódon, ele pode formar um par de bases com um resíduo de citosina ou uma uracila na posição 3′ do códon. Se o resíduo de adenosina modificado, inosina, aparece na posição 5′ do anticódon, ele pode formar um par de bases com uma uracila, adenosina ou até citosina na posição 3′ do códon (Tabela 33.3). Isso permite que um tRNA com o anticódon GAG para decodificar os códons CUU e CUC, ambos codificando uma leucina. A oscilação fornece um mecanismo para lidar eficientemente com a degeneração do código genético uma vez que a degeneração ocorre no terceiro resíduo do códon.

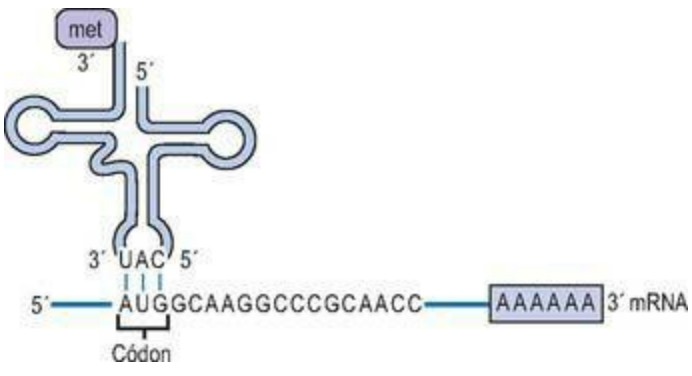


Fig. 33.2 Interação do tRNA carregado com o mRNA. A interação de um tRNA carregado com um mRNA ocorre pelo pareamento das bases complementares na alça de anticódon e no códon do mRNA.

Tabela 33.3 As possibilidades de pareamento de bases entre a ter-ceira posição do nucleotídeo 3′ do códon do mRNA e a primeira posição ou nucleotídeo 5′ do anticódon do tRNA.

Possibilidades de pareamento de bases códon-anticódon	
Códon, terceira posição ou 3′ (mRNA)	**Anticódon, primeira posição ou 5′ (tRNA)**
G	C
U	A
A ou G	U
C ou U	G
A ou C ou U	I

Como o ribossomo sabe onde começar a síntese proteica?

A molécula de mRNA carrega a informação que será usada para dirigir a síntese da proteína. No entanto, nem toda informação contida no mRNA é utilizada para esse propósito. A maioria dos mRNAs eucarióticos possui regiões tanto antes quanto depois da região que codifica a proteína, chamadas de sequências flanqueadoras 5′ e 3′ ou UTRs (do inglês *untranslated regions* ou regiões não traduzidas) 5′ e 3′. Essas sequências estão envolvidas na regulação do sítio e da taxa de síntese proteica e na estabilidade do mRNA. Deste modo, a região que codifica a proteína não começa imediatamente no início do mRNA, o que levanta a questão de como o ribossomo sabe por onde iniciar a síntese. No caso das células eucarióticas, o ribossomo primeiro se liga à estrutura cap 7-metilguanina (Cap. 32) na extremidade 5′ do mRNA e então se move ao longo da molécula até encontrar o primeiro códon AUG (Fig. 33.3). Isso sinaliza o ribossomo a começar a sintetizar a

proteína, iniciando com um resíduo de metionina, e continuar até encontrar um dos códons de término. Em alguns mRNAs virais e eucarióticos o primeiro AUG não é utilizado e ao invés disso um códon de início alternativo é definido por um sítio de entrada interno do ribossomo (IRES, do inglês *internal ribossome entry site*; Fig. 33.3).

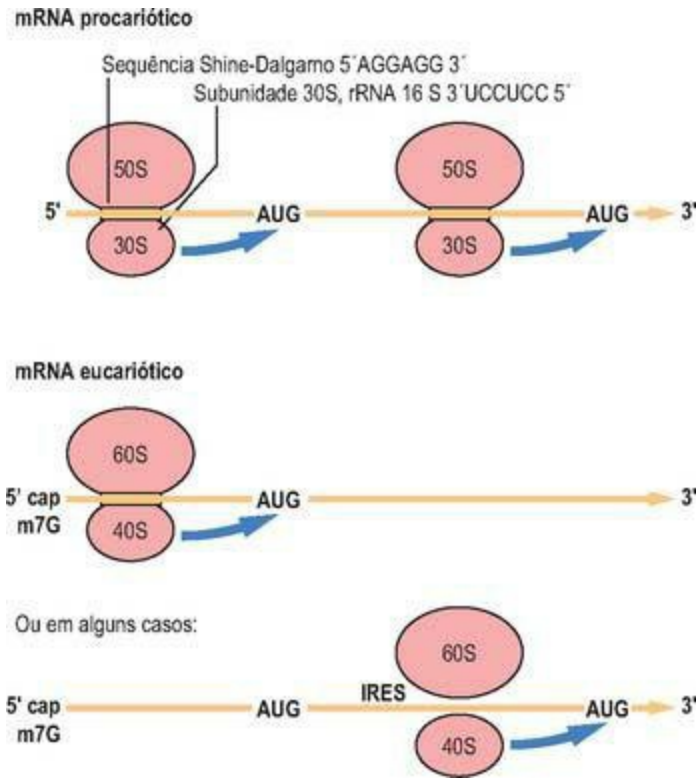


Fig. 33.3 Encontrando a região que codifica uma proteína. O ribossomo se liga ao mRNA antes de localizar a região que codifica a proteína. Ribossomos bacterianos (uma porção do rRNA 16 S) se liga a sequências complementares no mRNA chamadas de sequências Shine-Dalgarno, que ficam próximas ao início da região que codifica a proteína. Ribossomos eucarióticos se ligam ao cap 5′ dos mRNAs e então se movem ao longo do mRNA até encontrarem o primeiro códon AUG ou em poucos casos eles se ligam internamente em um sítio de entrada interno do ribossomo (IRES) e então se deslocam para o AUG.

No caso de células bacterianas, saber qual é a porção do mRNA a ser utilizada para sintetizar uma proteína é complicado pelo fato de poder haver várias proteínas codificadas por um único mRNA, cada uma independente uma da outra, permitindo que proteínas de sequências diferentes sejam obtidas da mesma sequência ribonucleica. Esse problema foi resolvido com a descoberta de uma sequência no mRNA que ajuda a posicionar o ribossomo precisamente no início de cada região que codifica uma proteína. Essa sequência, conhecida como a sequência Shine-Dalgrano, é encontrada na maioria dos mRNAs bacterianos e é complementar à porção 16 S do rRNA na subunidade ribossomal pequena da bactéria. Pela formação de ligações de hidrogênio o ribossomo é então posicionado no início de cada região que codifica para uma proteína.

O PROCESSO DA SÍNTESE PROTEICA

A tradução é um processo dinâmico que envolve a interação de enzimas, tRNAs, ribossomos, fatores de tradução e mRNA de maneiras específicas para produzir uma molécula de proteína capaz de realizar uma função celular específica. A tradução é normalmente divida em três estágios:

- iniciação
- alongamento
- terminação

Iniciação

O início da síntese proteica em eucariotos ocorre quando uma pequena subunidade dissociada do ribossomo forma um complexo com fatores de iniciação eucarióticos (eIF, do inglês *eukaryotic initiation factors*), eIF-1A, eIF-2 e eIF-3, que se ligam a um complexo eIF-2/Met-tRNA. Esse complexo pré-iniciação é direcionado para a extremidade 5′ do mRNA ao ligar o eIF-4F, e outros fatores, ao cap 5′. O complexo explora o mRNA até localizar o primeiro códon AUG, utilizando ATP para potencializar este processo. A subunidade ribossomal grande então se liga ao complexo da subunidade pequena/Met-tRNA/mRNA, e a Met-tRNA é por fim direcionada para o sítio P (Fig. 33.4), um processo que requer a eIF-5, hidrolisando GTP e liberando os fatores de iniciação. Em células eucarióticas, existem pelo menos 12 fatores de iniciação diferentes. Em células procarióticas, o processo envolve três fatores de iniciação e o complexo de iniciação se forma pela primeira vez imediatamente antes da porção 5′ da região codificante, como resultado da interação do rRNA 16 S na subunidade ribossomal pequena com a sequência Shine-Dalgarno no mRNA. A N-formil metionina (fmet), codificada por AUG, é o primeiro aminoácido em todas as proteínas bacterianas, ao invés de metionina.

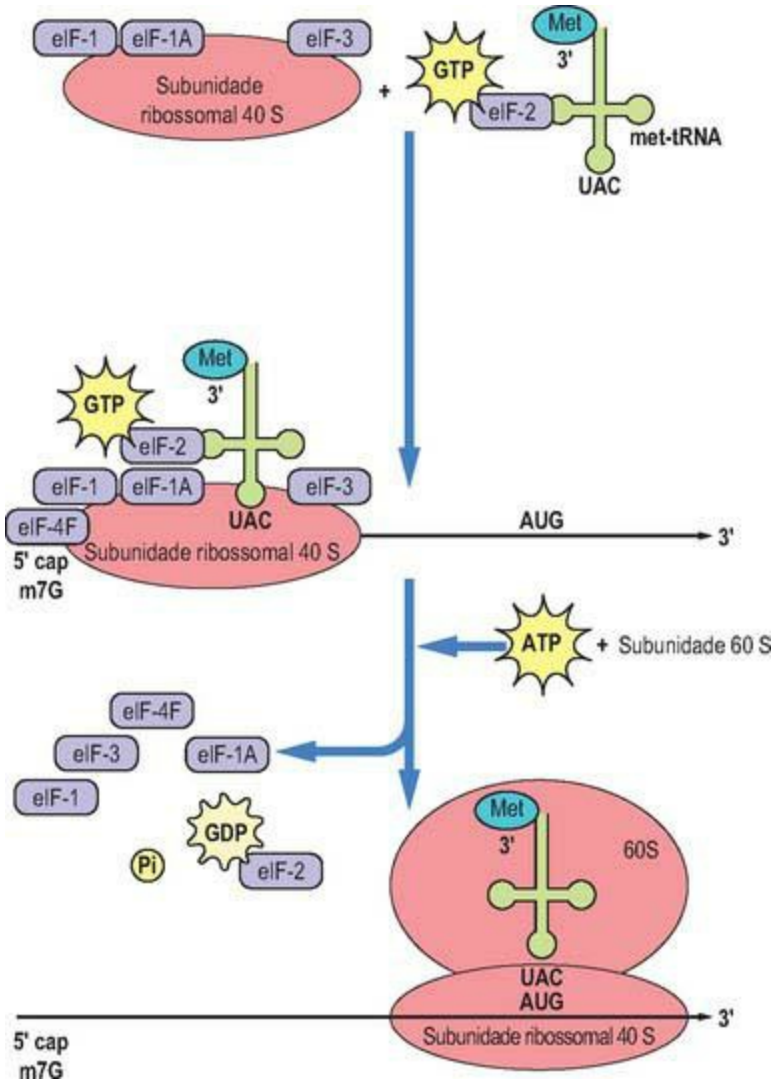


Fig. 33.4 Iniciação da síntese proteica em células eucarióticas. A subunidade ribossomal 40 S com os fatores de iniciação eIF-1, eIF-1 A e eIF-3 ligados à ela, o mRNA com o eIF-4 ligado ao cap 5′ e o met-tRNA ligado ao eIF-2 são aproximados. Uma vez que esses componentes são montados, o complexo se desloca até o AUG (explorando e hidrolisando ATP). A subunidade ribossomal 60 S

completa o complexo de iniciação e no processo os fatores de iniciação são liberados. Note que, na iniciação, o sítio P é ocupado pelo met-tRNA iniciador. GDP, guanosina difosfato; eIF, fator de iniciação eucariótico.

Os fatores envolvidos no estágio de alongamento da síntese proteica são alvo de alguns antibióticos

Uma vez que a iniciação foi completada, o processo de tradução da informação no mRNA em uma proteína funcional se inicia. O alongamento começa com a ligação do tRNA carregado ao sítio A do ribossomo. Em células eucarióticas, a molécula de tRNA carregada é levada ao ribossomo pela ação do fator de alongamento chamado de eEF-1A (Fig. 33.5). Para que o eEF-1A esteja ativo ele precisa estar associado a uma molécula de GTP. Se o tRNA carregado for correto, no qual o seu anticódon forma pares de bases com o códon do mRNA, então o GTP é hidrolisado e o eEF-1A é liberado. Para que o fator eEF-1A leve outra molécula de tRNA carregada para o ribossomo, ele deve ser regenerado por um fator de alongamento chamado de eEF-1B que promoverá a associação de eEF-1A e GTP para que ele possa se ligar a outra molécula de tRNA carregada (Fig. 33.5). Uma vez que a molécula correta de tRNA carregado tenha sido entregue ao sítio A do ribossomo, a atividade peptidil transferase do ribossomo catalisa a formação da ligação peptídica entre o aminoácido no sítio A e o aminoácido na extremidade final da cadeia peptídica crescente no sítio P. O complexo tRNA-cadeia peptídica está agora transientemente ligado ao sítio A. O ribossomo é então deslocado um códon a frente no mRNA (em direção a extremidade 3′), com a ajuda de um fator conhecido como eEF-2, e o tRNA no sítio A, com a cadeia peptídica em formação ligada a ele, se desloca em direção ao sítio P. O tRNA descarregado originalmente no sítio P se desloca para o sítio E de modo que se tenha um total de nove pares de nucleotídeos envolvidos na estabilização do complexo ribossomo-mRNA-tRNA. O processo todo se repete para a adição do próximo aminoácido (Fig. 33.6). Esse processo complexo é idêntico em células procarióticas, mas os fatores são diferentes e isso ajuda a explicar a utilidade de antibióticos que inibem preferencialmente a síntese proteica em bactérias (Tabela 33.4).

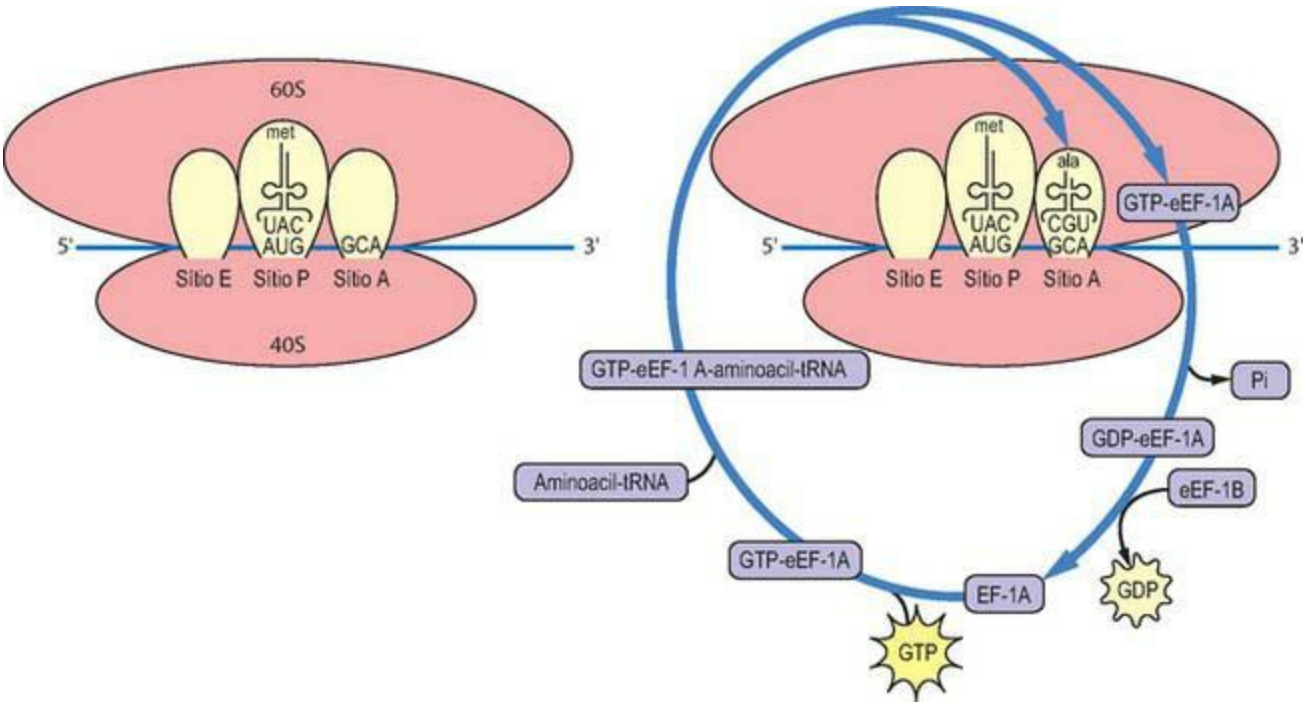


Fig. 33.5 Reciclagem do fator de alongamento eEF-1 A. Uma molécula de tRNA carregado é levada ao sítio A do complexo de

iniciação, com a ajuda do eEF-1 A ligado à GTP, para iniciar o processo de alongamento. O fator é liberado uma vez que o GTP é hidrolisado e o processo de reciclagem do eEF-1 A é auxiliado pelo fator de troca eEF-1 B. Cada adição sucessiva de aminoácido requer que uma molécula de tRNA corretamente carregado seja levada ao sítio A do ribossomo. ala, alanina; Pi, fosfato inorgânico.

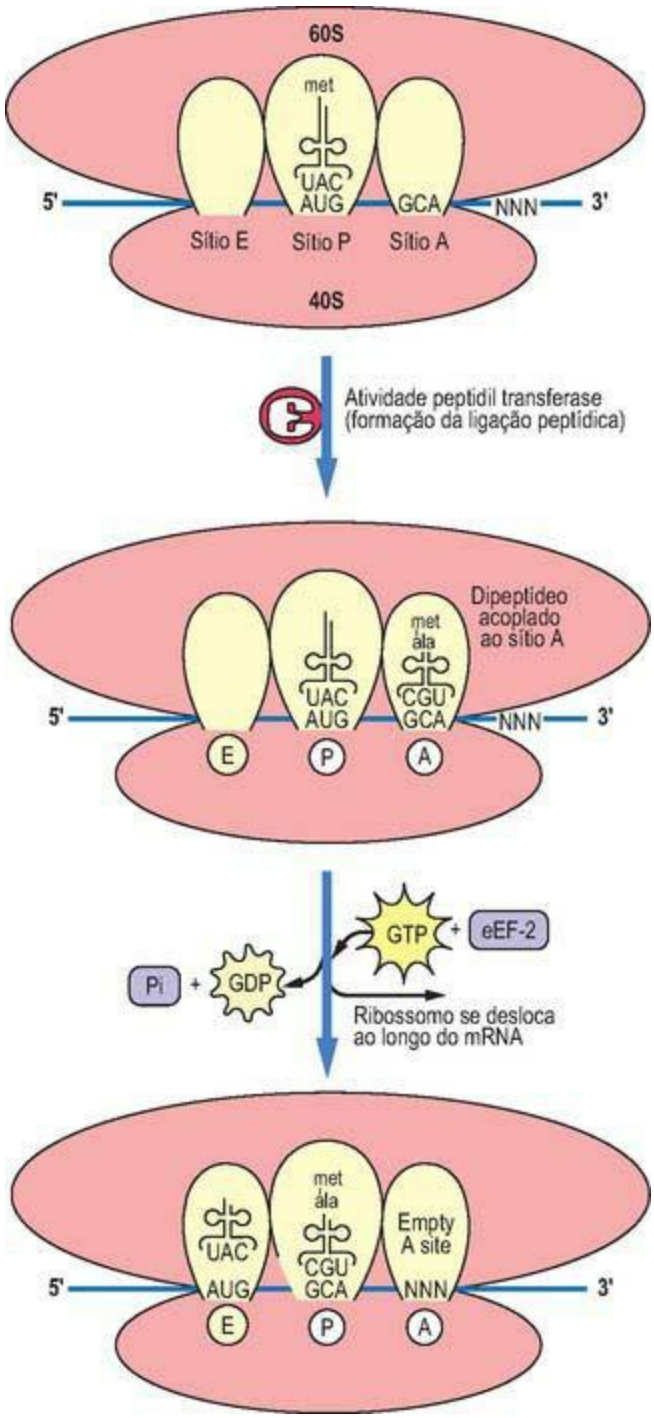


Fig. 33.6 Formação da ligação peptídica e translocação. A formação da ligação peptídica entre cada aminoácido sucessivo é catalisada pela peptidil transferase. Uma vez que a ligação peptídica esteja formada, um fator de alongamento (eEF-2 nesse caso) se desloca um códon a frente no mRNA, para que o sítio A fique vazio e pronto para receber o próximo tRNA carregado. O sítio E se encontra agora ocupado pelo tRNA não carregado (met).

Tabela 33.4 Antibióticos e seus alvos. A cido-hexamida é tóxica para humanos.

Antibióticos e seus alvos	
Antibiótico	**Alvo**
Tetracidina	sítio A do ribossomo bacteriano
Estreptomicina	subunidade 30 S do ribossomo bacteriano
Eritromicina	subunidade 50 S do ribossomo bacteriano
Clorafenicol	peptidil transferase do ribossomo bacteriano
Puromicina	leva ao término prematuro
Cido-hexamida	ribossomo eucariótico 80 S

Terminação

A terminação da síntese proteica tanto em células eucarióticas quanto bacterianas ocorre quando o sítio A do ribossomo alcança um dos códons de término do mRNA. Fatores proteicos chamados de fatores de liberação reconhecem esses códons e levam à liberação da proteína acoplada a última molécula de tRNA (Fig. 33.7). Esse processo é uma reação que depende de energia e é catalisada pela hidrólise de GTP, que transfere uma molécula de água para a extremidade final da proteína, assim liberando-a do tRNA. Após a liberaçã da proteína recém-sintetizada, as unidades ribossomais, o tRNA e o mRNA se dissociam, permitindo a tradução de uma nova molécula de mRNA (Fig. 33.4).

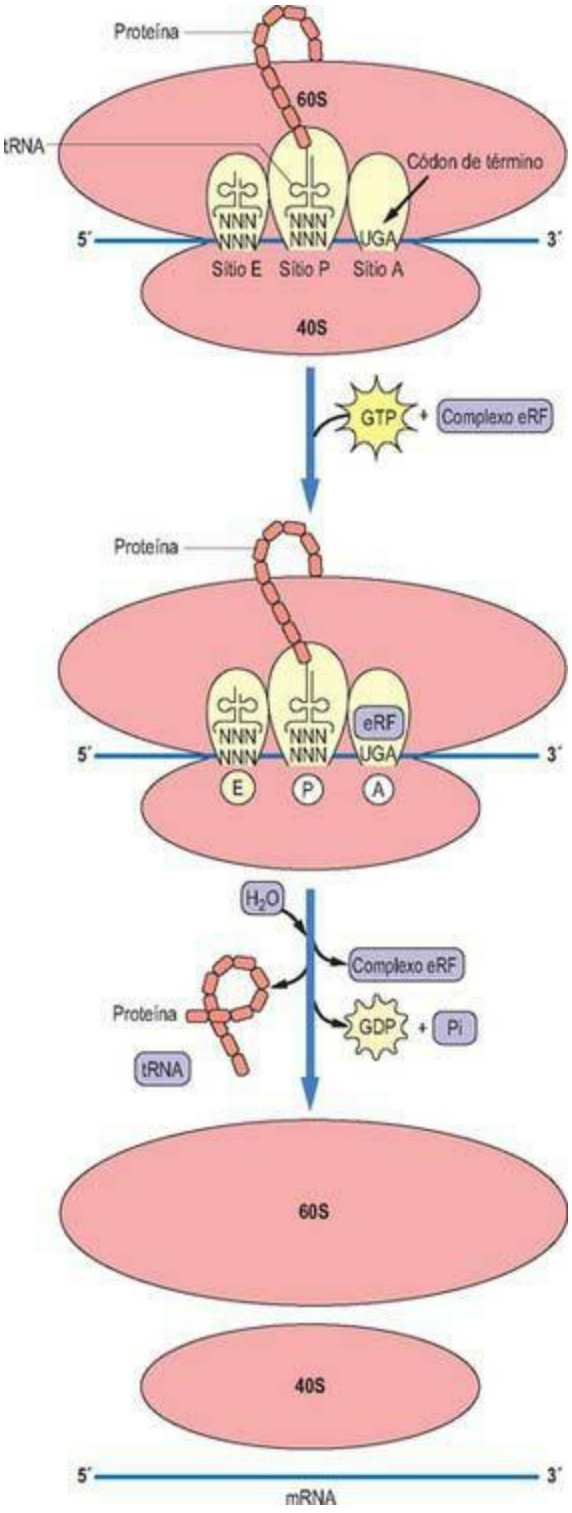


Fig. 33.7 Terminação da síntese proteica. A terminação da síntese proteica ocorre quando o sítio A é colocado sobre um códon de término. Um complexo de fatores de liberação (eRF), com o eRF-1 no sítio A, leva à liberação da proteína completa e à dissociação do ribossomo, mRNA e tRNA para que estes possam iniciar outro ciclo de tradução.

UM PACIENTE A QUEM FOI PRESCRITO UM ANTIBIÓTICO E QUE NÃO ADERIU AO TRATAMENTO

Um jovem que você estava tratando de uma infecção por sinusite retorna ao seu consultório após uma semana, ainda reclamando de dores de cabeça e congestão nasal. Ele explica que começou a se sentir melhor mais ou menos três dias após começar a tomar o antibiótico tetraciclina, que você prescreveu. Você pergunta se ele continuou a tomar a dose total do medicamento, mesmo após começar a se sentir melhor. Ele admite relutantemente que, assim que começou a se sentir melhor, parou de tomar o medicamento. Como você explicaria para o seu paciente que é importante que ele tome o medicamento pelo tempo que você prescreveu, mesmo que ele comece a se sentir melhor somente após alguns dias de tratamento?

Comentário. Como médico, você sabe que a tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro que inibe a maquinaria de síntese proteica de células bacterianas se ligando ao sítio A do ribossomo (Tabela 33.4). Você também sabe que, se o medicamento é removido, a síntese proteica pode recomeçar. Se o medicamento não for tomado por todo o período recomendado, as bactérias podem voltar a crescer levando à ressurgência da infecção. Além disso, aquelas bactérias que começam a crescer após o término prematuro do tratamento são provavelmente as que possuem maior resistência ao medicamento. Por causa da seleção de cepas mutantes mais resistentes, a infecção secundária provavelmente será mais difícil de controlar.

SÍNTESE PROTEICA: PEPTIDIL TRANSFERASE

A peptidil transferase não é uma enzima típica. É uma ribozima.

A enzima peptidil transferase possui a atividade responsável pela formação da ligação peptídica durante a síntese proteica. Essa ati-vidade enzimática catalisa a reação entre o grupamento amino do aminoacil – tRNA no sítio A e o carbono carboxílico do peptidil-tRNA no sítio P, formando uma ligação peptídica de uma ligação éster. A atividade está localizada no ribossomo, mas nenhuma das proteínas ribossomais é capaz de catalisar essa reação. Estruturas cristalinas do ribossomo bacteriano 50S mostraram que o centro da peptidil transferase é composto inteiramente de rRNA e, apesar da necessidade de proteínas ou aminoácidos específicos para posicionar os tRNAs ou estabilizar a estrutura do rRNA não poder ser descartada, a atividade catalítica reside no RNA ribossomal.

ENOVELAMENTO DE PROTEÍNAS

Para uma proteína recém-sintetizada se tornar funcionalmente ativa, ela deve se dobrar em uma estrutura tridimensional única. Como existem várias conformações aleatórias que a proteína recém-sintetizada pode adotar, as proteínas chegam a suas estruturas nativas com a ajuda de uma classe proteínas chamadas chaperonas. As chaperonas se ligam a regiões hidrofóbicas expostas nas proteínas desenoveladas e previnem a interação entre elas, protegendo as superfícies interativas. Essa restrição permite que a proteína recém-formada se dobre na conformação correta sem permitir a formação de agregados não específicos. As chaperonas promovem o enovelamento correto da proteína recém-sintetizada por ciclos de ligação da proteína (substrato) e desligamento regulados por uma atividade ATPásica e por cofatores proteicos. Proteínas de choque térmico são um grupo de chaperonas que são expressas por células em resposta a altas temperaturas; elas auxiliam no reenovelamento de proteínas desnaturadas, não só como resultado ao calor mas também em resposta ao estresse físico e químico. As consequências do enovelamento errado das proteínas podem ser graves e existem várias doenças que são consequência de um enovelamento defeituoso (Cap. 2). Em muitos casos, incluindo algumas formas de fibrose cística (Cap. 6) e doença de Gaucher (Cap. 27), alterações na sequência de aminoácidos de uma proteína levam à síntese de uma proteína com enovelamento errado que é degradada no retículo endoplasmático ou no citoplasma. Doenças neurodegenerativas como o Alzheimer possuem agregados insolúveis de proteína amiloide maldobrada na forma de placas no cérebro.

DIRECIONAMENTO DE PROTEÍNAS E MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS

Um mRNA pode ter vários ribossomos ligados a ele em um dado momento e isso é conhecido como um poliribossomo ou polissomo (Fig. 33.8). Existem duas classes gerais de polissomos encontradas nas células: aqueles que estão livres no citoplasma e aqueles acoplados ao retículo endoplasmático (RE). Os mRNAs que codificam proteínas destinadas ao citoplasma ou núcleo são traduzidos principalmente em polissomos livres no citoplasma, enquanto mRNAs que codificam proteínas de membrana e de secreção são traduzidos em polissomos acoplados ao RE. Regiões do RE cobertas com ribossomos são descritas como retículo endoplasmático rugoso (RER).

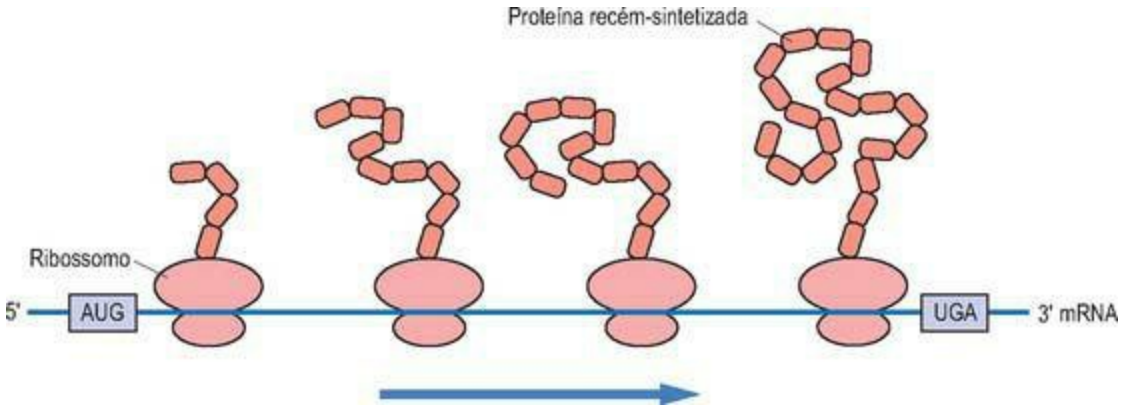


Fig. 33.8 Síntese de proteína nos polissomos. As proteínas podem ser sintetizadas por diversos ribossomos ligados a um mesmo mRNA, formando uma estrutura conhecida como polissomo.

O destino celular das proteínas é determinado por suas sequências peptídicas sinalizadoras

Proteínas destinadas a exportação, inserção na membrana ou a organelas celulares específicas devem ser distinguidas de alguma maneira de proteínas residentes no citoplasma. Essa característica distintiva das proteínas destinadas a esses locais é a presença de sequência sinalizadora geralmente compreendendo os primeiros 20-30 aminoácidos na porção aminoterminal da proteína. No caso de proteínas secretadas ou de membrana, logo após a síntese da sequência sinalizadora, esta é reconhecida por um complexo ribonucleoproteico conhecido como partícula de reconhecimento de sinal (SRP, do inglês *single recognition particle*), composta por um RNA pequeno e seis proteínas. A SRP se liga a sequência sinalizadora e pausa a tradução do restante da proteína. Esse complexo então se liga ao receptor para SRP localizado na membrana do retículo endoplasmático. Depois que a SRP entrega o mRNA ligado ao ribossomo com sua proteína nascente para o retículo endoplasmático, a sequência sinalizadora é inserida através da membrana, a SRP se dissocia, e a tradução continua com o deslocamento da cadeia polipeptídica, à medida que é sintetizada, através da membrana para o espaço intersticial do retículo endoplasmático (Fig. 33.9). A proteína é então transferida para o complexo de Golgi e de lá para seu destino final.

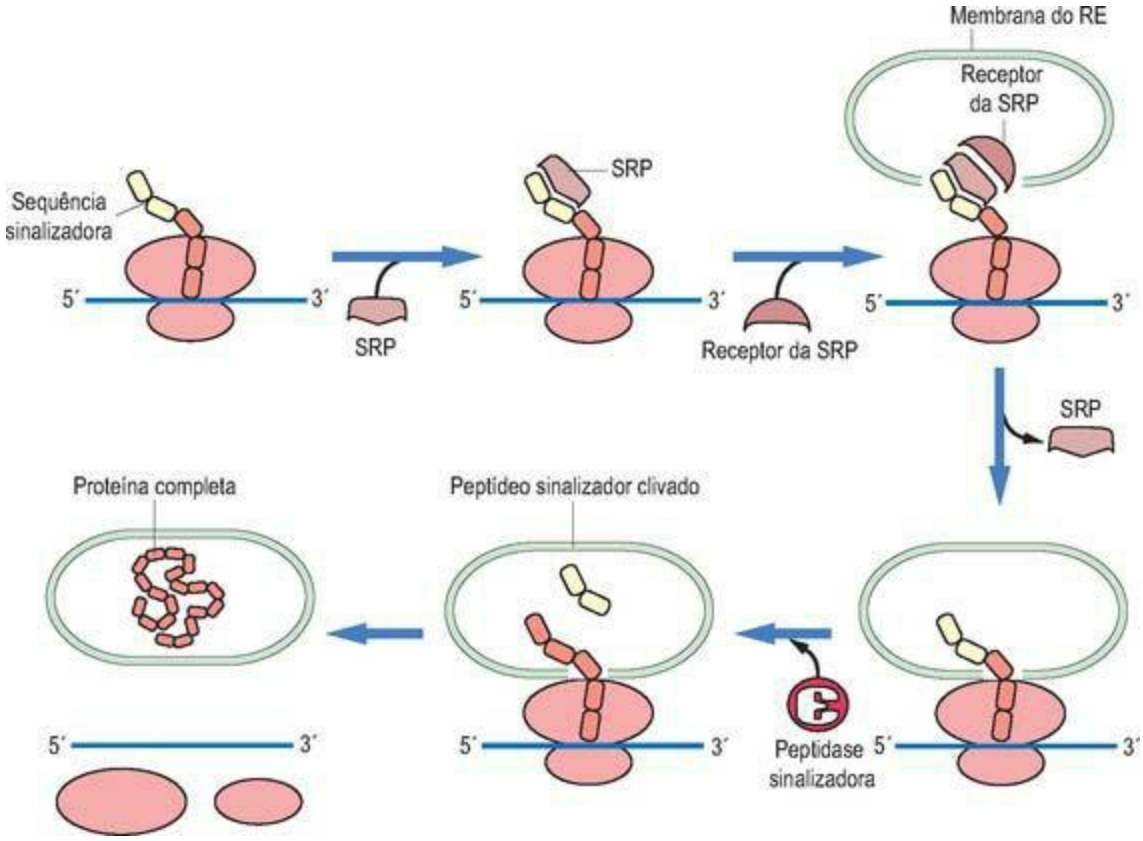


Fig. 33.9 Síntese de proteína no retículo endoplasmático. As proteínas podem ser direcionadas para locais específicos na célula pelo reconhecimento da sequência sinalizadora por uma SRP. Esse complexo é então reconhecido pela proteína de ancoragem da SRP (receptor da SRP) no retículo endoplasmático (RE), onde a sequência sinalizadora é inserida através da membrana. Uma peptidase sinalizadora, em geral remove a sequência sinalizadora, mas não em toda proteína. Uma vez que a síntese da proteína esteja completa, a proteína é levada a sua localização celular.

Tanto proteínas mitocondriais quanto nucleares possuem também sequências sinalizadoras que as marcam para serem transportadas do local de tradução para suas respectivas organelas, porém diferentemente das proteínas secretadas ou de membrana, proteínas mitocondriais e nucleares são transportadas depois que a tradução está completa. No caso de proteínas destinadas para a mitocôndria, elas podem ter duas sequências sinalizadoras na sua porção *N*-terminal, dependendo de se elas são destinadas à matriz ou ao espaço intermembranar. Proteínas mitocondriais devem ser desenoveladas antes de ser transportadas por transportadores nas membranas interna e externa (TMI e TME; Fig. 9.3). Por sua vez, proteínas nucleares podem ter sinais de localização nuclear em qualquer parte da sequência da proteína, desde que expostas na superfície desta, e não precisam ser desenoveladas antes do transporte. Os poros nucleares são complexos muito grandes e podem acomodar o reconhecimento e transporte de uma proteína em seu estado nativo.

Modificações pós-traducionais

Várias proteínas precisam ser alteradas por modificação química dos aminoácidos antes de se tornarem biologicamente ativas; coletivamente, essas alterações são conhecidas como modificações pós-traducionais. É dentro do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi que ocorrem duas das principais modificações pós-traducionais de proteínas. No retículo endoplasmático, uma enzima chamada peptidase sinalizadora remove a sequência sinalizadora da porção amino-terminal da proteína, resultando em uma proteína madura que é de 20-30 aminoácidos mais curta que a codificada pelo mRNA. No retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, cadeias laterais de carboidrato são adicionadas e modificadas em sítios específicos na proteína (Cap. 26). Uma das modificações aminoterminais mais comuns em células eucarióticas é a remoção do resíduo de metionina aminoterminal que inicia a síntese da proteína. Finalmente, várias proteínas, como os hormônios insulina e glucagon, são sintetizadas como pré-proteínas e pró-proteínas que devem ser clivadas proteoliticamente para se tornarem ativas. A clivagem de um precursor em sua forma biologicamente ativa é geralmente realizada por uma protease específica e é um evento celular regulado.

Proteassomas: maquinaria celular para a reciclagem de proteínas

A degradação de proteínas é um processo complexo que é crítico para a regulação celular. Em geral, diferentemente do DNA, proteínas danificadas não são reparadas, mas sim degradadas e os aminoácido são reciclados. Existem diversas razões para que uma proteína precise ser degradada. A proteína simplesmente está desgastada – ela envelheceu passivamente por desnaturação gradual devido ao estresse ambiental normal. As proteínas também podem ser modificadas por reação com compostos intracelulares reativos, tais como intermediários glicolíticos, ou por reação com produtos da peroxidação lipídica durante o estresse oxidativo (Cap. 37). Outras proteínas podem ser parte de respostas celulares a hormônios ou talvez componentes do ciclo celular ou são fatores de transcrição; elas precisam ser retiradas, à s vezes rapidamente, para atenuar a resposta ou o sinal. Algumas dessas últimas proteínas possuem sequências de aminoácidos características ou resíduos *N*-terminais que promovem sua reciclagem rápida. A sequência PEST (ProGluSerThr) marca algumas proteínas para reciclagem rápida, enquanto proteínas como uma arginina *N*-terminal geralmente possuem uma meia-vida curta se comparadas com proteínas com uma metionina *N*-terminal.

Como a degradação proteica é um processo destrutivo, ela deve ser confinada a organelas celulares específicas. Lisossomos, por exemplo, ingerem e degradam mitocôndrias danificadas e outras organelas membranosas. No entanto, proteínas citoplasmáticas mais solúveis são degradadas em estruturas chamadas proteassomas. O proteassoma 26 S (Fig. 33.10) consiste em dois tipos de subunidades: uma protease multicatalítica (MCP, do inglês *multicatalytic protease*) multimérica 20 S e uma ATPase 19 S. O proteassoma é uma estrutura em forma de barril, formada pelo empilhamento de quatro anéis de sete monômeros homólogos, subunidades tipo α nas porções externas e subunidades tipo β nos anéis internos do barril. A atividade proteolítica – três tipos diferentes de treonina protease – se encontram nas subunidades β com os sítios ativos virados para dentro do barril, protegendo assim as proteínas citoplasmáticas de degradação não apropriada. As subunidades de ATPase estão acopladas a qualquer uma das extremidades do barril e agem como porteiros, permitindo que somente proteínas destinadas à degradação entrem no barril. As proteínas são desenoveladas em um processo que requer ATP e degradada pela atividade das proteases em pequenos peptídeos, de 6-9 aminoácido de comprimento, que são liberados no citoplasma para o restante da degradação.

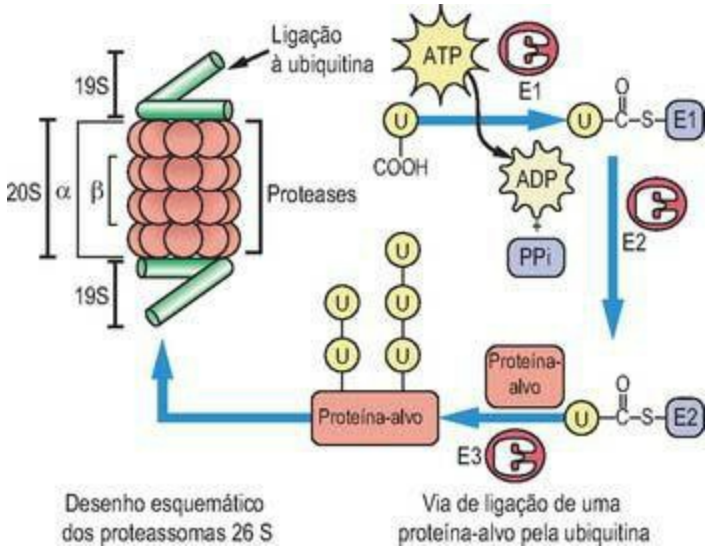


Fig. 33.10 Estrutura do proteassoma e o papel da ubiquitina (u) na reciclagem de proteína. O proteassoma é apresentado à esquerda, uma estrutura em forma de barril. A protease multicatalítica 20 S nos anéis do meio do barril possuem atividade de protease voltadas para a face interna. Os caps 19 S na extremidade do barril possuem atividade ligadora e desligadora de ubiquitina e atividade de ATPase controlando o acesso de proteínas ao interior do barril para degradação. O ciclo da ubiquitina está envolvido na marcação de proteínas para degradação pelo proteassoma. A ubiquitina é inicialmente ativada como um derivado tioéster da enzima ativadora de ubiquitina E1; ela é, então, transferida para a enzima conjugadora de ubiquitina E2 e, em seguida, para um resíduo de lisina na proteína-alvo, catalisada pela ubiquitina ligase E3. A ubiquitina é frequentemente copolimerizada nas proteínas-alvo. Quanto mais ubiquitinada estiver a proteína, mais suscetível ela é à degradação proteassômica. Note que o desenho não está em escala; o proteassoma é um complexo macromolecular de 26 S (> 2.000.000 Da); as proteínas-alvo são menores enquanto o peso molecular da ubiquitina é menor que 10.000 Da. (Compare com o Cap. 29, pág. 394.)

Proteínas destinadas à degradação são direcionadas para o proteassoma principalmente por uma modificação covalente com uma proteína de 76 resíduos de aminoácido altamente conservada chamada de ubiquitina, que é encontrada em todas as células. A ubiquitina deve ser ativada para cumprir seu papel (Fig. 33.10); isso é realizado por uma enzima ativadora de ubiquitina chamada E1. A ativação ocorre quando a E1 é acoplada por meio de uma ligação tioéster à porção C-terminal da ubiquitina pela formação de um intermediário ubiquitina-adenilato impulsionada por ATP. A ubiquitina ativada é então acoplada a uma ubiquitina carreadora de proteína, conhecida como E2, por uma ligação tioéster. Uma proteína ligase de ubiquitina conhecida como E3 transfere a ubiquitina de E2 para a proteína-alvo, formando uma ligação isopeptídica entre o terminal carboxila da ubiquitina e o grupo amino ε de um resíduo de lisina na proteína-alvo. Proteínas desnaturadas e oxidadas são geralmente ubiquitinadas por esse mecanismo. A subunidade 19 S do proteassoma possui um sítio ligador de ubiquitina que permite que a proteína covalentemente acoplada à ubiquitina entre no barril; a ubiquitina é então liberada por uma atividade de ubiquitinase e reciclada para o citosol para novo uso. A polimerização da ubiquitina em proteínas-alvo (poliubiquitinação) aumenta significativamente a degradação da proteína.

INIBINDO O PROTEASSOMA PARA TRATAR O CÂNCER

O mieloma múltiplo é um câncer de células plasmáticas (linfócitos B) que são normalmente encontradas nos ossos e sintetizam anticorpos como parte do sistema imune (Cap. 2). O crescimento descontrolado dessas células plasmáticas resulta em anemia, tumores nos ossos, uma resposta imune comprometida e infelizmente normalmente um prognóstico ruim. Pacientes com mieloma múltiplo

recorrente possuem poucas opções de tratamento, mas um novo fármaco que é um inibidor da atividade proteolítica do proteassoma, bortezomib, foi adicionado ao arsenal. Ele mostrou melhorar as chances de sobrevivência desses pacientes e aumentar a duração do tempo antes da remissão, especialmente quando combinado com outras terapias tais como radiação ou quimioterapia adicional. O bortezomib parece atuar inibindo a degradação de proteínas envolvidas na morte celular programada (apoptose) das células cancerosas, aumentando assim o sinal de autodestruição nas células do mieloma.

A via de ubiquitina que leva a degradação proteassômica das proteínas é complexa. Apesar de o número de enzimas E1 ser tipicamente pequeno, existem várias proteínas E2 e E3 com diferentes alvos específicos, e existem seis atividades ATPásicas diferentes associadas à subunidade 19 S do proteassoma. Se cogita que as ATPases estão envolvidas na desnaturação das proteínas ubiquitinadas. Essas variações, assim como as mudanças durante o ciclo celular e em resposta à estimulação hormonal, fornecem uma via flexível e regulada para a reciclagem de proteínas.

Resumo

A síntese proteica é o ponto alto da transferência da informação genética do DNA para as proteínas. Nessa transferência, a informação deve ser traduzida da linguagem de quatro nucleotídeos do DNA e do RNA para a linguagem de 20 aminoácidos das proteínas. O código genético, no qual três nucleotídeos no mRNA (códon) especificam um aminoácido, representa o dicionário de tradução entre essas duas linguagens. A molécula de tRNA é a ponte entre essas duas linguagens. O tRNA realiza essa tarefa por meio de sua alça de anticódon que interage com códons específicos no mRNA e também com aminoácidos por meio de seu sítio de acoplamento de aminoácido localizado na extremidade 3′ da molécula. O processo de tradução consiste em três partes: iniciação, alongamento e terminação. A iniciação envolve a montagem do ribossomo com o tRNA carregado no códon de iniciação (AUG) do mRNA. Esse processo de montagem é mediado por fatores de iniciação e requer o gasto de energia na forma de GTP. O alongamento é uma adição ponto a ponto dos aminoácidos individuais do ribossomo à cadeia peptídica em crescimento pela ação da ribozima, peptidil transferase. As moléculas de tRNA carregadas são levadas ao ribossomo por fatores de alongamento à custa da hidrólise de GTP. A terminação da síntese proteica ocorre quando o ribossomo chega a um códon de término e fatores de liberação catalisam a liberação da proteína. Após a liberação, a proteína recém-sintetizada deve ser enovelada corretamente com a ajuda de proteínas auxiliares chamadas chaperonas. Várias proteínas recém-sintetizadas também devem ser modificadas, por uma série de mudanças químicas e estruturais, antes que sejam biologicamente ativas. Uma vez que uma proteína não é mais necessária, ela é degradada intracelularmente por um complexo macromolecular igualmente complicado chamado proteassoma.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Reveja o mecanismo de ação de vários fármacos que inibem a síntese proteica no ribossomo bacteriano.

2. Liste os mecanismos que asseguram a fidelidade do DNA e da síntese proteica.

3. Descreva as sequências sinalizadoras que direcionam as proteínas para o lisossomo, a mitocôndria ou o núcleo.

4. Discuta o papel do aminoácido *N*-terminal como um fator regulatório da taxa de reciclagem de uma proteína citoplasmática.

5. Explique como os vírus controlam a maquinaria de tradução de proteínas da célula durante uma infecção viral para favorecer a síntese de proteínas virais.

Leituras sugeridas

Anderson RM, Kwon M, Strobel SA. Toward ribosomal RNA catalytic activity in the absence of protein. *J Mol Evol*. 2007;64:472-483.

Egea PF, Stroud RM, Walter P. Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol*. 2005;15:213-220.

Noller H. RNA structure: reading the ribosome. *Science*. 2005;309:1508-1514.

Ogle JM, Carter AP, Ranakrishnan V. Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem Sci*. 2003;28:259-266.

Outeiro TF, Tetzlaff J. Mechansims of disease II: cellular protein quality control. *Semin Pediatr Neurol*. 2007;14:15-25.

Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene*. 2006;25:6717-6730.

Rodnina MV, Beringer M, Wintermeyer W. How ribosomes make peptide bonds. *Trends Biochem Sci*. 2006;32:20-26.

Sites

Código genético Código genético. www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi?mode=c.

Banco de dados sobre o tRNA Banco de dados sobre o tRNA. http://lowelab.ucsc.edu/GtRNAdb/.

IRES IRES. www.iresite.org.

Ribossoomo Ribossoomo:

- www.mrc-lmb.cam.ac.uk/ribo/homepage/mov_and_overview.html
- www.weizmann.ac.il/sb/faculty_pages/Yonath/home.html

Proteassoma Proteassoma:

- http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/P/Proteasome.html

Ubiquitina Ubiquitina. www.rcsb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb60_1.html.

Regulação da Expressão Gênica

J.R. Patton

D.M. Hunt

A. Jamieson

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os mecanismos gerais de regulação da expressão gênica, com ênfase no início da transcrição.

- Descrever os muitos níveis pelos quais a expressão gênica pode ser controlada, usando a expressão gênica induzida por esteroide como modelo.

- Explicar como o *splicing* alternativo de mRNA, os promotores substitutos para o início da síntese de mRNA, a edição pós-transcricional do mRNA, e a inibição da síntese de proteína por RNAs pequenos podem modular a expressão de um gene.

- Explicar como a estrutura e o empacotamento da cromatina podem afetar a expressão gênica.

- Explicar como o *imprinting* genômico afeta a expressão gênica, dependendo se os alelos são de herança materna ou paterna.

INTRODUÇÃO

O estudo dos genes e o mecanismo através do qual a informação que eles armazenam é convertida em proteínas e enzimas, hormônios e moléculas de sinalização intracelular são o domínio da biologia molecular. Um dos aspectos mais fascinantes deste trabalho é o estudo dos mecanismos que controlam a expressão gênica, tanto no tempo como no espaço, e as consequências caso estes mecanismos sejam perdidos.

O objetivo deste capítulo é introduzir os conceitos básicos envolvidos na regulação de genes que codificam proteínas e como esses processos estão comprometidos com as causas das doenças humanas. Primeiro, o mecanismo básico da regulação gênica será descrito, seguido da discussão de um sistema de regulação gênica específico para destacar vários aspectos do mecanismo básico. O capítulo terminará com uma discussão das diversas maneiras pelas quais o aparato regulador gênico pode ser adaptado para se ajustar à s necessidades dos diferentes tecidos e situações.

MECANISMOS BÁSICOS DA EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão gênica inclui diversos processos diferentes

O controle da expressão gênica em seres humanos ocorre principalmente ao nível de transcrição, a síntese de mRNA. No entanto, a transcrição é apenas a primeira etapa da conversão da informação genética codificada por um gene no produto gênico final processado, e tem se tornado cada vez mais evidente que eventos pós-transcricionais permitem o controle excelente da expressão gênica. A sequência de eventos envolvidos na expressão final de um gene específico pode ser resumida como:

Início da transcrição

→ processamento do transcrito
→ transporte para o citoplasma
→ tradução do transcrito em proteína
→ processamento pós-transcricional da proteína

Em cada uma dessas etapas, as condições permitem que a célula prossiga para o próximo passo ou atenue ou pare o processo. Por exemplo, se o processamento do RNA não está correto ou completo, o mRNA resultante seria inútil ou possivelmente destruído. Além disso, se o mRNA não é transportado para fora do núcleo, ele não será traduzido. Evidentemente, durante o crescimento de um embrião humano de um único ovo fertilizado até um bebê recém-nascido, devem ocorrer inúmeras mudanças na regulação dos genes, para permitir a diferenciação de uma única célula em muitos tipos celulares que desenvolvem características específicas do tecido. De modo similar, na puberdade existem mudanças na secreção de hormônios pituitários que resultam na secreção cíclica de hormônios ovarianos e adrenais nas mulheres e a produção de características sexuais secundárias. Tais eventos programados são comuns a todos os organismos celulares e a produção dessas mudanças fenotípicas nas células – e, portanto, no organismo como um todo – surge como resultado de alterações na expressão de genes-chave. A expressão dos genes essenciais para esses processos varia dependendo do tipo celular e do estágio do desenvolvimento, mas os mecanismos que fundamentam as mudanças estão disponíveis a basicamente todas as células. Em seres humanos e na maioria dos outros eucariotos, são inúmeros os mecanismos que regulam a expressão gênica; algumas das exigências e opções disponíveis a cada um dos estágios estão esquematizados na Tabela 34.1.

Tabela 34.1 Exigências e opções para o controle da expressão gênica.

Regulação da expressão gênica		
Processo	**Exigências**	**Opções**
Transcrição do mRNA	a cromatina é relaxada (a cromatina condensada é um molde ruim)	transcrição alelo-específica
	DNA no estado hipometilado (metilação do promotor inibe a transcrição))	seleção de promotores alternativos, resultando em diferentes sítios de início
	fatores de ação *trans* corretos estão presentes (tais como fatores e cofatores de transcrição)	
	adição do cap no terminal 5′ do mRNA	sítios poli-A alternativos alteram o terminal 3′ do mRNA
	a cauda poli-A é	muitos transcritos sofrem

Processamento do mRNA	adidonada ao terminal 3′ da maioria das mensagens	*splicing*alternativo, aumentando o potencial de cocli-ficação
	para a maioria dos mRNAs, o transcrito sofre *splicing*	os mRNAs podem ser editados para alterar a sequência codificadora, mudando aminoácidos ou criando um códon de parada
		sinais no 3′ UTR dos mRNAs podem estabilizar ou marcar o RNA para degradação
Tradução do mRNA	o mRNA deve ser transportado para o citoplasma	o mRNA pode estar localizado em regiões específicas do citoplasma, tais como os terminals dos axônios, para tradução local
	todos os fatores necessários para a sintese de proteína	códons alternativos de início devido aos IRES
		tradução nos ribossomos livres ou no ER
		miRNAs podem inibir a tradução
Renovação (*turnover*) de proteínas	proteina de meia-vida única	proteínas estruturais tendem a ser renovadas lentamente (proteínas no músculo)
		proteínas do ciclo celular são rapidamente renovadas para limitar a mitose
		proteínas que contêm sequências que as marcam para ubiquitinação

A transcrição gênica requer a presença de elementos-chave na região do gene

A etapa essencial na transcrição de um gene que codifica proteína é a conversão da informação armazenada no DNA do gene em RNA mensageiro, que pode, então, ser usado como molde para a síntese do produto proteico do gene. Para a expressão de um gene ocorrer, a enzima que catalisa a formação de mRNA, a RNA polimerase II (RNApol II), deve ser capaz de reconhecer o chamado

ponto de início de transcrição do gene. A RNAPol II usa uma fita do DNA molde para criar um RNA novo, complementar (frequentemente chamado transcrito primário ou pré-mRNA), que é, então, modificado de várias maneiras, (comumente incluindo a adição de um cap (proteção) m^7GPPP no terminal 5′, a cauda poli-A no terminal 3′, e a remoção de íntrons para formar um mRNA maduro (Cap. 32). No entanto, a RNAPol II não pode iniciar a transcrição sozinha; ela requer outros fatores para assistir no reconhecimento de sequências gênicas críticas e outras proteínas ligadas nas vizinhanças do ponto de início de transcrição.

Promotores

As sequências que estão relativamente próximas ao início da transcrição de um gene e controlam sua expressão são coletivamente chamadas de promotoras. Como geralmente estão distantes algumas centenas ou alguns milhares de nucleotídios do ponto de início, são normalmente denominadas promotoras proximais. A sequência promotora atua como uma unidade de reconhecimento básica, sinalizando que existe um gene que pode ser transcrito e fornecendo a informação necessária para a RNAPol II reconhecer o gene e iniciar corretamente a síntese de RNA, tanto no local correto quanto usando a fita correta do DNA como molde. O promotor também desempenha um papel importante ao determinar que o RNA seja sintetizado no momento exato na célula certa. A maioria das regiões de controle do promotor está em posição anterior (*upstream*) (5′) ao ponto de início de transcrição, e, portanto, não são transcritas em RNA. Ocasionalmente, alguns elementos do promotor podem estar em posição posterior (*downstream*) ao ponto de início da síntese de RNA e podem de fato ser transcritos em RNA. A estrutura dos promotores varia de gene para gene, mas existem vários elementos de sequência-chave que podem ser identificados dentro do promotor. Esses elementos podem estar presentes em combinações diferentes, alguns elementos estando presentes em um gene e ausentes em outro. Sequências mais distantes do local de início da transcrição, algumas das quais são conhecidas como acentuadoras (*enhancers*), podem também ter um impacto importante na transcrição de um gene. Frequentemente se diz que estes elementos fazem parte do promotor distal do gene.

A eficiência e a especificidade da expressão gênica são conferidas por elementos de ação cis

Um promotor exerce seu efeito porque ele está no mesmo segmento de DNA que o gene que está sendo transcrito e é designado como uma sequência ou um elemento de ação *cis* para enfatizar que ele afeta somente o gene próximo no mesmo cromossomo. Uma vez que o promotor é crítico para a expressão gênica, é frequentemente reconhecido como sendo parte do gene que ele controla, visto que sem ele o mRNA não seria sintetizado.

A sequência de nucleotídio imediatamente ao redor do início da transcrição de um gene varia de gene para gene. Entretanto, o primeiro nucleotídeo no transcrito de mRNA tende a ser adenosina (A), geralmente seguido por uma sequência rica em pirimidina, denominada iniciador (Inr). Em geral, ele tem a sequência de nucleotídeos Py_2CAPy_5 (Py-base pirimidínica; C-citidina; A-adenosina) e é encontrado entre as posições –3 e +5 em relação ao ponto de início. Além do Inr, a maioria dos promotores possui uma sequência conhecida como TATA box, localizada aproximadamente 25 pb acima (*upstream*) do início da transcrição. O TATA box tem uma sequência consenso de 8 pb que geralmente consiste inteiramente em pares de bases adenina-timina (A-T), embora muito raramente um par guanina-citosina (G-C) possa estar presente. Essa sequência parece ser muito importante no processo de transcrição, já que substituições de nucleotídeos que interrompem o TATA box resultam em uma redução marcante da eficiência da transcrição. As posições do Inr e do TATA box em relação ao início são relativamente fixas (Fig. 34.1). Tendo dito isso, deve ser apontado que muitos genes eucarióticos não têm um TATA box identificável e que outras sequências são essenciais para delinear o início da transcrição.

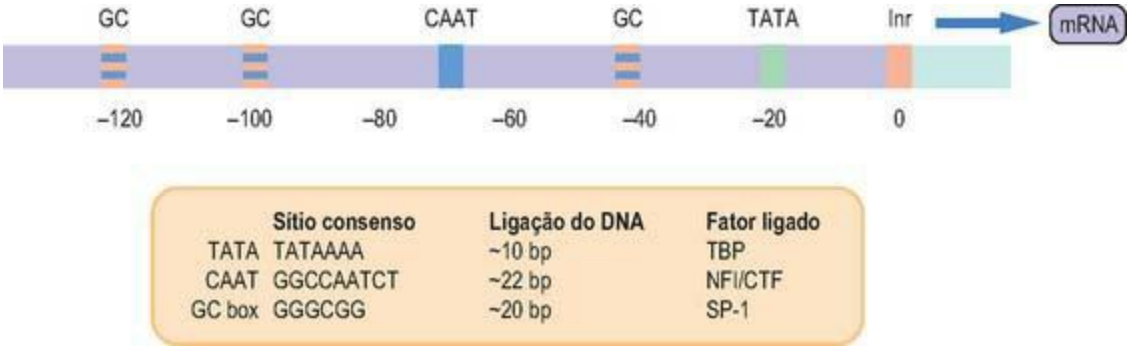


Fig. 34.1 Versão idealizada de um promotor incluindo vários elementos. Cada elemento do promotor tem uma sequência consenso específica que se liga a fatores ubíquos que ativam a transcrição. A ligação de fatores de transcrição envolve o sítio consenso e um número variável de nucleotídios adjacentes anônimos, dependendo do elemento promotor. CTF, um membro de uma família de proteína cujos membros atuam como fatores de transcrição; TBP, proteína de ligação ao TATA; NFI, fator nuclear I; SP-1, fator de transcrição ubíquo. (compare com a Figura 32.5).

Além do TATA box, outros elementos promotores de ação *cis* comumente encontrados têm sido descritos. Por exemplo, o CAAT box é frequentemente encontrado em posição anterior (*upstream*) ao TATA box, tipicamente distante cerca de 80 pb do início da transcrição. Como no caso do TATA box, ele pode ser mais importante por sua capacidade de aumentar a força do sinal promotor do que de controlar a expressão tecido ou tempo-específica do gene. Outro elemento promotor comumente observado é o GC box, uma sequência rica em GC; cópias múltiplas podem ser encontradas em uma única região promotora.

N a Figura 34.1, estão listados alguns dos elementos comuns de ação *cis* vistos dentro dos promotores. Estes elementos promotores se ligam a fatores proteicos (fatores de transcrição) que reconhecem a sequência de DNA de cada elemento em particular. Alguns fatores de transcrição estimulam a transcrição, outros a suprimem; alguns são expressos ubiquamente, outros são expressos em um padrão tecido ou tempo específico. Portanto, a disposição dos fatores ligados a uma região promotora pode variar de célula para célula, tecido para tecido, e ser afetado pelo estado do organismo. Esses fatores, ligados a sequências promotoras, determinam quão ativamente a RNAPol II copia o DNA em RNA.

Promotores alternativos

Embora esteja claro que um promotor seja essencial para a expressão gênica ocorrer, um único promotor pode não possuir a especificidade tecidual ou a especificidade do estágio de desenvolvimento necessária para permitir que ele direcione a expressão de um gene sempre no tempo e no local corretos. Alguns genes desenvolveram uma série de promotores que conferem expressão tecido-específica. Além do uso de diferentes promotores que estão fisicamente separados, cada um dos promotores alternativos frequentemente está associado ao seu primeiro éxon e, como resultado, cada mRNA e a proteína subsequente tem um terminal 5′ e uma sequência de aminoácidos tecido-específicos. Um bom exemplo do uso de promotores alternativos em seres humanos é o gene para a distrofina, a proteína do músculo deficiente na distrofia muscular de Duchenne (Cap. 20). Esse gene usa promotores alternativos que originam proteínas específicas do cérebro, músculo e retina, todas com sequências de aminoácidos *N*-terminal diferentes.

ELEMENTOS CONSENSO

Identificando a função e a especificidade de sequências de nucleotídios

As sequências consenso são sequências nucleotídicas que contêm elementos centrais únicos que identificam a função e a especificidade da sequência, por exemplo, o TATA box. A sequência do elemento pode diferir por alguns poucos nucleotídios em difeêrentes genes, mas uma sequência central, ou consenso, está sempre presente. Em geral, as diferenças não influenciam na eficiência da sequência. Essas sequências consenso são reconhecidas por comparação dos promotores dos mesmos genes de diferentes espécies de eucariotos, por comparação de sequências dos promotores de genes que se ligam ao mesmo fator de transcrição, ou determinando-se a sequência real de DNA que serve como elemento de ligação para o fator (Fig. 34.1).

Acentuadores

Embora o promotor seja essencial para o início da transcrição, não necessariamente influencia sozinho a força da transcrição de um gene específico. Outro grupo de elementos conhecidos como acentuadores pode regular o nível da transcrição de um gene, mas diferentemente dos promotores, suas posições podem variar enormemente em relação ao ponto de início e sua orientação não tem efeito na sua eficiência. Os acentuadores podem estar acima (*upstream*) ou abaixo (*downstream*) de um promotor e podem ser importantes em conferir transcrição tecido-específica. Por exemplo, um promotor não específico pode iniciar a transcrição somente em presença de um acentuador tecido-específico. Alternativamente, um promotor tecido-específico pode iniciar a transcrição, mas com uma eficiência bastante aumentada na presença de um acentuador próximo que não é tecido-específico. Em alguns genes, por exemplo, os genes da imunoglobulina, os acentuadores podem de fato estar presentes abaixo (*downstream*) do ponto de início da transcrição, dentro de um íntron do gene que esteja sendo ativamente transcrito.

Elementos de resposta

Elementos de resposta são sequências de nucleotídeos que permitem estímulos específicos, tais como hormônios esteroides (elemento de resposta a esteroide; SRE), AMP cíclico (elemento de resposta ao AMP cíclico; CRE) ou fator de crescimento 1 semelhante à insulina (IGF-1, elemento de resposta à insulina; IRE), para estimular ou reprimir a expressão gênica. Os elementos de resposta são frequentemente parte dos promotores ou acentuadores, onde eles funcionam como sítios de ligação de fatores de transcrição específicos. Os elementos de resposta nos promotores são sequências de ação *cis* com um comprimento tipicamente da ordem de 6-12 bases. Um único gene pode possuir vários elementos de resposta diferentes, possivelmente tendo a transcrição estimulada por um estímulo e inibida por outro. Múltiplos genes podem possuir o mesmo elemento de resposta, e isto facilita a coindução ou a correpressão de grupos de genes, tais como em resposta a um estímulo hormonal.

Fatores de transcrição

Promotores, acentuadores e elementos de resposta são partes do gene: fatores de transcrição são as proteínas que reconhecem estas estruturas. Essas proteínas de ligação a sequências específicas do DNA se ligam a sequências específicas de nucleotídeos e produzem expressão diferencial do gene durante o desenvolvimento e também nos tecidos do organismo maduro (Fig. 34.2). Muitos fatores de transcrição atuam positivamente e promovem a transcrição, enquanto outros atuam negativamente e promovem o silenciamento do gene. O padrão único dos fatores de transcrição presentes na célula determinará, em grande parte, qual porção do genoma será transcrita em RNA em qualquer célula. Os fatores de transcrição são algumas vezes denominados como fatores de "ação *trans*" para enfatizar que, como proteínas solúveis, eles podem se difundir dentro do núcleo e atuar em múltiplos genes diferentes em cromossomos distintos.

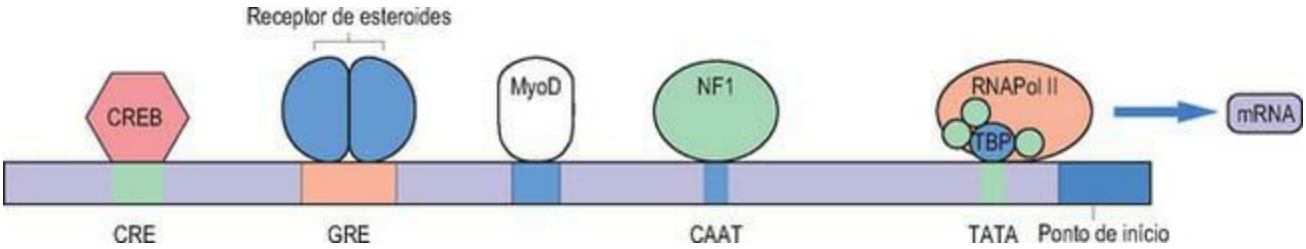


Fig. 34.2 Regulação da expressão gênica por elementos reguladores específicos. A ligação de fatores de transcrição a um elemento de resposta a esteroides modula a taxa de transcrição da mensagem. Diferentes elementos têm efeitos variáveis no nível de transcrição, alguns exercendo efeitos maiores do que outros, e podem também ativar a expressão tecido-específica. CRE, elemento de resposta ao AMP cíclico; CREB, proteína de ligação ao CRE; GRE, elemento de resposta ao glicocorticoide; MyoD, fator de transcrição célula muscular-específico; NF1, fator nuclear 1. As proteínas são mostradas em uma disposição linear por conveniência, mas elas interagem fisicamente umas com as outras, tanto por causa do seu tamanho como por causa do empacotamento do DNA.

Existem outros tipos de proteínas envolvidas na regulação da transcrição além dos fatores de transcrição sequência-específicos. Os chamados fatores de transcrição gerais, tais como TFIIA, B, D, E etc., formam um complexo com RNAPol II e este complexo é necessário para o início da transcrição. Os fatores de transcrição gerais são necessários para o uso bem-sucedido de todo promotor; eles variam de certa forma com a classe do gene, sendo geralmente diferentes para as RNA polimerases I, II e III. Em células eucarióticas e células de mamíferos, em particular, as próprias RNA polimerases não podem reconhecer as sequências promotoras. É função dos fatores gene-específicos criar um ambiente local que possa com sucesso atrair os fatores gerais, que, por sua vez, atrairão a polimerase.

Além disso, outras proteínas podem se ligar a fatores de transcrição sequência-específicos e modular a sua função ao reprimir ou ativar a expressão gênica; esses fatores são frequentemente chamados coativadores ou correpressores. Portanto, a taxa global da transcrição de RNA de um gene é resultado do efeito recíproco complexo de uma enormidade de fatores de transcrição, coativadores e correpressores. Uma vez que existem milhares desses fatores em uma célula, existe um número grande, quase inimaginável, de combinações que podem ocorrer e, portanto, o controle da expressão gênica pode ser muito específico e muito sutil.

Em procariotos, os elementos *cis* que controlam o local de início e, em geral, o início da

transcrição estão posicionados mais próximos do ponto de início, eles são em um número menor e existe muito menos variedade (Cap. 32). Além disso, existem menos fatores de ação *trans* e o controle da expressão gênica é muito menos sutil. No entanto, entender as limitações do controle da expressão gênica em procariotos permite apreciar a flexibilidade das estratégias de controle encontradas em eucariotos.

O QUE É UM "GENE"? UNIDADE DE TRANSCRIÇÃO *VERSUS* GENE

Definir o que é exatamente um "gene" tem se tornado muito difícil nos últimos anos. A ideia inicial de que um gene era um segmento do DNA que origina um produto gênico único – um gene, uma proteína – tem sido contestada. Está claro que muitos produtos funcionais – espécies de mRNA diferentes ou diferentes produtos gênicos – podem se originar de uma única região do DNA transcrito, como resultado de diferenças ao nível de transcrição ou ao nível pós-transcricional. Portanto, existe agora uma tendência de se referir a tais "genes" como unidades de transcrição. A unidade de transcrição engloba não apenas as partes do gene, tais como promotores, éxons e íntrons, classicamente denominados como unidade gênica, mas também os elementos moleculares que modificam o processo de transcrição do seu início até as modificações pós-transcricionais finais. Essa é uma mudança da ideia de que um gene é uma fita de DNA com éxons e íntrons, para uma ideia de um gene sendo uma estrutura complexa que direciona um processo dinâmico, originando o produto ou os produtos gênicos finais nos vários estágios do desenvolvimento de um organismo.

O início da transcrição requer a ligação de fatores de transcrição ao DNA

Para a transcrição ocorrer, os fatores de transcrição devem se ligar ao DNA. A proteína conhecida como proteína de ligação ao TATA (TBP) se liga à região do TATA box. A TBP é um fator de transcrição geral, associada ao complexo da RNAPol II e um número variável de outras proteínas. A ligação da TBP ao TATA box direciona o posicionamento do aparato de transcrição a uma distância fixa do ponto de início da transcrição e, portanto, permite que a RNAPol II seja posicionada exatamente no local de início da transcrição. Uma vez que a RNAPol II e vários outros fatores de transcrição tenham se ligado à região do ponto de início, a transcrição pode ocorrer. Quando a transcrição se inicia, muitos fatores de transcrição necessários para a ligação e o alinhamento da RNAPol II são liberados e a polimerase se desloca ao longo do DNA, formando o transcrito de pré-mRNA.

Os fatores de transcrição têm estruturas comuns que permitem a ligação do DNA

A ligação dos fatores de transcrição ao DNA envolve uma área relativamente pequena da proteína fator de transcrição, que está em estreito contato com a fenda maior e/ou menor do DNA dupla hélice a ser transcrito. As regiões dessas proteínas que entram em contato com o DNA são chamadas domínios ou motivos (*motifs*) de ligação ao DNA, e são altamente conservadas entre as espécies. Existe uma variedade de domínios de ligação ao DNA, alguns dos quais ocorrem em diversos fatores de transcrição ou em vários momentos no mesmo fator. Quatro classes comuns de domínios de ligação ao DNA são os motivos de hélice-volta-hélice e hélice-alça-hélice, os dedos de zinco (a seguir), e os *zippers* de leucina. A maioria dos fatores de transcrição sequência-específica contém pelo menos um desses motivos de ligação ao DNA; proteínas com função desconhecida que contêm qualquer desses motivos provavelmente são fatores de transcrição. O fator de transcrição

médio tem 20 ou mais sítios de contato com o DNA, que amplifica a força e a especificidade do contato.

Além de um domínio de ligação ao DNA, os fatores de transcrição sequência-específicos também têm um domínio regulador de transcrição que é necessário para sua capacidade de modular a transcrição. Este domínio pode funcionar de várias maneiras. Pode interagir diretamente com o complexo RNA polimerase-fator de transcrição geral, pode ter efeitos indiretos via proteínas coativadoras ou correpressoras, ou pode estar envolvido em remodelar a cromatina (a seguir) e, então, alterar a capacidade do promotor de recrutar outros fatores de transcrição.

Uma maneira de caracterizar a interação de um fator de transcrição com uma sequência de DNA específica é por meio da técnica denominada ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA; Fig. 34.3). Esse método tem sido usado para ajudar na purificação de fatores de transcrição, identificá-los em misturas complexas (tais como um extrato celular), delinear o tamanho do sítio de ligação, e estimar a força da interação entre o fator e a sequência de DNA que ele reconhece.

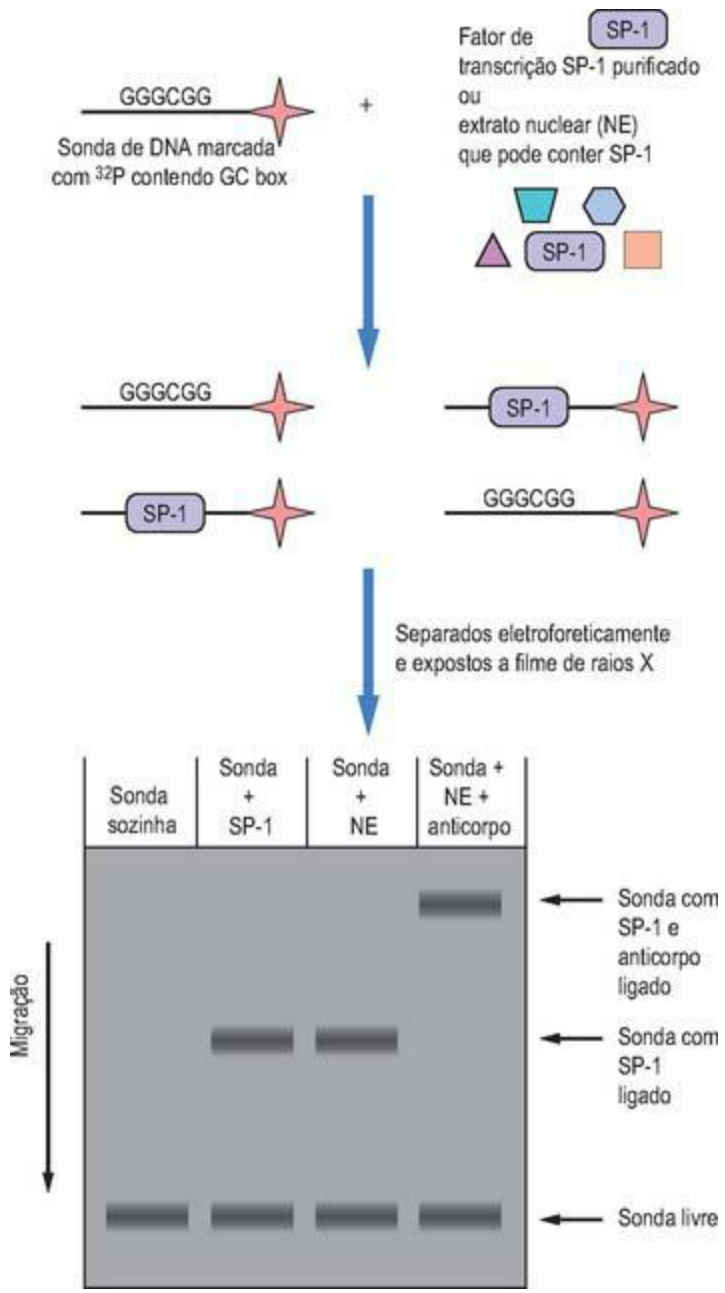


Fig. 34.3 Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA). Os componentes básicos do método de EMSA estão incluídos no diagrama. Nesse exemplo, uma sonda de DNA marcada com ^{32}P é primeiramente incubada com o fator de transcrição SP-

1 purificado ou com o extrato nuclear (NE) que contém SP-1 e, então, submetida à eletroforese em gel nativo (não desnaturante). Se SP-1 se liga à sonda ele apresenta uma mobilidade menor no gel do que a sonda sem a proteína ligada (sonda livre). Se um anticorpo para SP-1 é incluído na reação com NE, então, o complexo sonda/SP-1 migra ainda mais lentamente, confirmando que a proteína ligada à sonda é de fato SP-1. EMSA pode ser usado para ajudar a caracterizar qualquer interação ácido nucleico-proteína, incluindo a interação de RNAs e proteínas.

RECEPTORES DE ESTEROIDES

Os receptores esteroides possuem muitas características de fatores de transcrição e fornecem um modelo para a função das proteínas de dedo de zinco na ligação ao DNA

Os hormônios esteroides têm uma grande gama de funções em seres humanos e são essenciais à vida normal. Eles são derivados de um precursor comum, o colesterol, e compartilham, portanto, uma parte estrutural similar (Cap. 17). Entretanto, diferenças na hidroxilação de certos átomos de carbono e na aromatização do anel A do esteroide originam diferenças marcantes no efeito biológico. Os esteroides produzem seus efeitos biológicos por se ligarem a receptores de hormônios esteroide-específicos; esses receptores são encontrados no citoplasma e no núcleo da célula. Para os receptores do tipo I (citoplasmático), o ligante esteroide induz mudanças estruturais que levam à dimerização do receptor e à exposição de um sinal de localização nuclear (NLS); esse sinal, tanto quanto a dimerização, é comumente bloqueado por uma proteína *heat shock*, que é liberada com a ligação do esteroide. O complexo ligante-receptor agora entra no núcleo, onde se liga ao DNA em um elemento de resposta específico, o SRE, alternativamente chamado elemento de resposta ao hormônio (HRE). Os SREs podem ser encontrados muitas quilobases acima (*upstream*) ou abaixo (*downstream*) do início da transcrição. O complexo esteroide-receptor funciona como um fator de transcrição sequência-específico, e a ligação do complexo ao SRE resulta na ativação do promotor e no início da transcrição (Fig. 34.4) ou, em alguns casos, na repressão da transcrição. Como seria de se esperar, por causa do grande número de esteroides encontrados em seres humanos, existe um número correspondentemente grande de proteínas receptoras de esteroides distintas, e cada uma dessas reconhece uma sequênêcia consenso, um SRE, na região de um promotor.

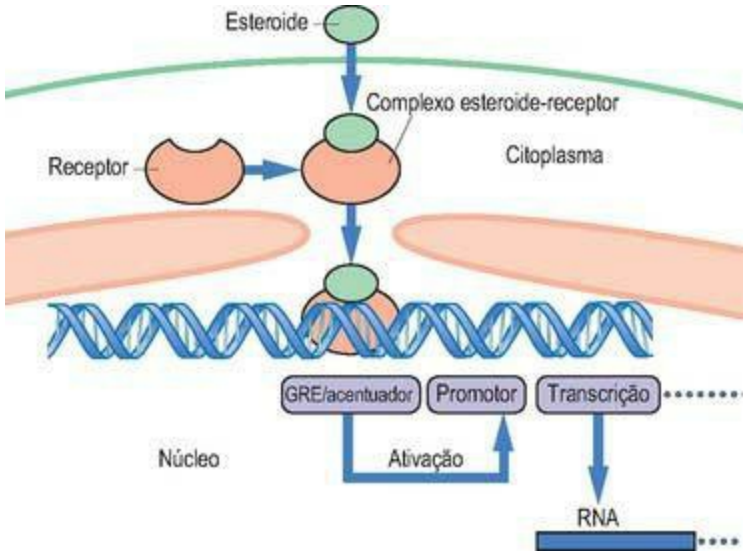


Fig. 34.4 Regulação da transcrição gênica por glicocorticoides. Os esteroides se ligam a moléculas do receptor que, por sua vez, se ligam a um acentuador, ativando a transcrição do gene. GRE, elemento de resposta ao glicocorticoide.

O motivo dedo de zinco (zinc finger)

Essencial ao reconhecimento do SRE no DNA, e à ligação do receptor a ele, é a presença da comumente chamada região de dedo de zinco no domínio de ligação ao DNA da molécula do receptor. Os dedos de zinco consistem em uma alça de peptídio com um átomo de zinco no seu centro. No dedo de zinco típico, a alça compreende dois resíduos de cisteína e dois de histidina em posições altamente conservadas uma em relação à outra, separadas por um número fixo de aminoácidos intermediários; os resíduos de Cys e His são coordenados ao íon zinco. O dedo de zinco medeia a interação entre a molécula do receptor de esteroide e o SRE na fenda maior do DNA dupla hélice, aumentando, portanto, a eficiência do promotor e conferindo-lhe especificidade. Os motivos dedo de zinco são geralmente organizados como uma série de dedos repetidos *in tandem;* o número de repetições varia nos diferentes fatores de transcrição. A estrutura precisa do dedo de zinco do receptor de esteroide difere da sequência consenso; os dois são comparados na Figura 34.5.

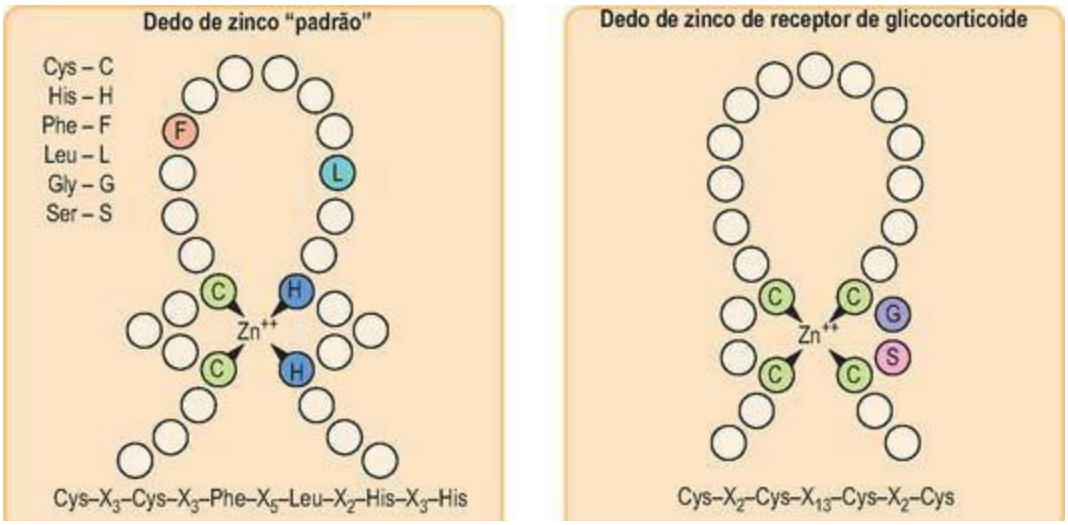


Fig. 34.5 Um dedo de zinco "padrão" e um dedo de zinco de receptor de esteroides. Os dedos de zinco são sequências que ocorrem comumente e que permitem a ligação de proteína ao DNA dupla fita. X, qualquer aminoácido intermediário.

As proteínas de dedo de zinco reconhecem e se ligam a pequenas sequências palindrômicas de DNA. Palíndromes são sequências de DNA lidas da mesma maneira (5′ a 3′) nas fitas antiparalelas, por exemplo, 5′-GGATCC-3′ é lida da mesma maneira que a sequência 5′ a 3′ na fita complementar. A dimerização do receptor e o reconhecimento de sequências idênticas nas fitas opostas fortalecem a interação entre o receptor e o DNA e, portanto, aumentam a especificidade do reconhecimento do SRE.

Organização da molécula do receptor de esteroide

Os receptores de esteroides são produtos de uma família de genes com similaridades importantes

Uma característica central de todas as proteínas receptoras de esteroides é a similaridade na organização de suas moléculas de receptor. Cada receptor tem um domínio de ligação ao DNA, um domínio de ativação da transcrição, um domínio de ligação ao hormônio esteroide, e um domínio de dimerização. Existem três características marcantes relativas à estrutura dos receptores de hormônios esteroides.

- A região de ligação ao DNA sempre contém uma região dedo de zinco altamente conservada, que se mutada resulta em perda de função do receptor.

- As regiões de ligação ao DNA de todos os receptores de hormônios esteroides têm um alto grau de homologia umas com as outras.

- As regiões de ligação ao esteroide apresentam um alto grau de homologia umas com as outras.

Essas características comuns têm identificado as proteínas receptoras de esteroide como produtos de uma família de genes. Parece que, durante o curso da evolução, a diversificação dos organismos resultou na necessidade de diferentes esteroides com ações biológicas variadas e, consequentemente, um gene ancestral único sofreu duplicação e alteração evolutiva ao longo dos milhões de anos, resultando em um grupo de receptores relacionados, mas ligeiramente diferentes (Fig. 34.6).

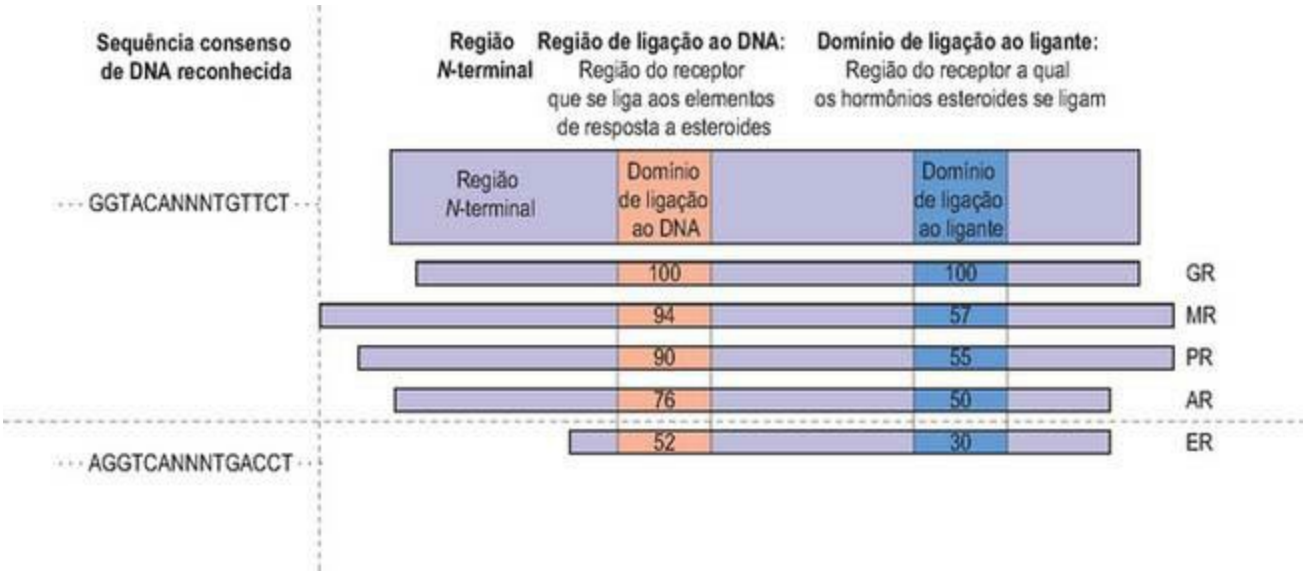


Fig. 34.6 Similaridades entre diferentes receptores de esteroides. As regiões de ligação ao DNA e de ligação ao hormônio dos receptores de esteroide compartilham um alto grau de homologia. O receptor de estrogênio é menos similar ao receptor de glicocorticoide do que os outros. AR, receptor de androgênio; ER, receptor de estrogênio; GR, receptor de glicocorticoide; MR, receptor de mineralocorticoide; PR, receptor de progesterona; NNN, quaisquer três nucleotídeos. Os números denotam % de homologia à sequência em GR.

FAMÍLIA DE GENES DOS RECEPTO-RES DE ESTEROIDES: RECEPTORES DO HORMÔNIO DA TIREOIDE

A família dos genes dos receptores de esteroides, embora grande, é de fato somente um subgrupo de uma família muito maior dos comumente conhecidos receptores de hormônios nucleares. Todos os membros dessa família têm a mesma estrutura básica que os receptores de hormônios esteroides: uma região *N*-terminal hipervariável, uma região de ligação ao DNA altamente conservada, uma região em dobradiça (*hinge*) variável, e um domínio de ligação ao ligante altamente conservado (Fig. 34.6). Eles estão separados em dois grupos básicos. Os receptores tipo I (citoplasmáticos) são um grupo de proteínas receptoras que formam homodímeros e se ligam especificamente a elementos de resposta a hormônios esteroides na presença de seu ligante, tais como o receptor de glicocorticoide. Os receptores tipo II (nucleares) formam homodímeros que podem se ligar a elementos de resposta na ausência de seu ligante, e podem também formar heterodímeros com outras subunidades de receptor tipo II para formar unidades ativas. Os receptores tipo II incluem os receptores de hormônio da tireoide, a vitamina D e os receptores do ácido retinoico.

ESTRATÉGIAS ALTERNATIVAS DE REGULAÇÃO GÊNICA EM SERES HUMANOS

Acesso ao promotor

O DNA no núcleo da celula está empacotado nos nucleossomos e estruturas de ordem superior, em associação com histonas e outras proteínas (Cap. 31). Portanto, os promotores de alguns genes podem não estar prontamente acessíveis aos fatores de transcrição, mesmo que estes estejam presentes no núcleo. Tem se tornado evidente que o grau de empacotamento de um promotor e a presença, a ausência ou a localização precisa dos nucleossomos em um promotor podem ter efeitos importantes no grau de acesso dos fatores de transcrição sequência-específicos e do complexo RNAPol II associado aos fatores de transcrição gerais. A cromatina condensada, onde o DNA está mais fortemente associado aos nucleossomos, não é geralmente um bom molde para a transcrição e, em muitos casos, é necessário que a remodelagem da cromatina ocorra antes que a transcrição aconteça.

O empacotamento das histonas, a estabilidade do nucleossomo e, portanto, a acessibilidade do DNA são controlados pela acetilação e desacetilação reversível de resíduos de lisina nas regiões amino-terminais das histonas centrais, particularmente histonas H3 e H4. As histona acetiltransferases (HAT) transferem grupos acetil da acetil-CoA para o grupamento amino das lisinas, neutralizando a carga do resíduo de lisina e enfraquecendo a força das interações histona-DNA, permitindo, assim, o relaxamento do nucleossomo. De modo inverso, as enzimas que removem os grupamentos acetil e promovem a condensação local do cromossomo são conhecidas como histona desacetilases (HDAC).

A acetilação e desacetilação reversível das histonas são importantes no controle da ativação dos promotores. De fato, alguns fatores de transcrição ou coativadores de transcrição exibem atividade HAT e podem remodelar a cromatina. No caso de alguns promotores, a ligação de um fator de transcrição pode resultar no reposicionamento dos nucleossomos da próxima vez que o DNA se replicar, tornando mais provável a transcrição do gene após a divisão celular. A interação dinâmica da estrutura da cromatina, do fator de transcrição e da ligação do cofator é importante para determinar se um gene será transcrito e com que eficiência a RNA polimerase o sintetizará.

A metilação do DNA regula a expressão gênica

Certos nucleotídios, principalmente a citidina, podem sofrer metilação enzimática sem afetar o pareamento Watson-Crick. Os resíduos de citidina metilados são quase sempre encontrados associados à guanosina, como o dinucleotídio CG, e no DNA dupla fita a citidina complementar também se encontra metilada, originando uma sequência palindrômica:

5′ mCpG 3′
3′ GpCm 5′

A presença da citidina metilada pode ser avaliada por suscetibilidade a enzimas de restrição (Cap. 35) que cortam o DNA em sítios contendo grupos CG somente se o CG não estiver metilado, em comparação com outras enzimas de restrição que cortam se o CG estiver ou não metilado. Além disso, uma técnica de sequenciamento com bissulfito, que conta com a reatividade diferencial da metil citidina, pode ser usada para mapear mais precisamente os sítios de metilação. Muitos genes em seres humanos (cerca de 50%) têm o que chamamos de ilha de CpG (CPI) na região de seus promotores. Geralmente estas CPI têm se mostrado não metiladas, exceto em certos estados patológicos e no câncer. Tem se tornado evidente que a metilação é geralmente associada a regiões do DNA que estão transcrevendo menos ativamente o RNA. A desmetilação de um promotor pode ser necessária para o início da transcrição, e a desmetilação de uma sequência codificadora do gene pode também ser necessária para a transcrição eficiente.



EPIGENÉTICA: NOVAS ESTRATÉGIAS PARA A QUIMIOTERAPIA

A metilação é um aspecto do estudo da epigenética, um campo amplo que, em geral, trata de modificações herdáveis de DNA e proteína que não alteram a sequência do DNA, mas que tem um impacto significativo na expressão gênica. A hipermetilação de genes supressores de tumor é comumente observada em cânceres humanos. Drogas que inibem a atividade da DNA metiltransferase estão sendo testadas como um meio de reativar esses genes reprimidos para o tratamento de leucemias. Os genes que regulam negativamente o crescimento celular são frequentemente reêprimidos por desacetilação de histonas, criando uma forma mais compacta (que não pode ser transcrita) de cromatina. A inibição desses genes suporta o fenótipo neoplásico do crescimento celular descontrolado. Inibidores de histona desacetilase (HDAC) estão sendo testados como agentes terapêuticos para o tratamento de cânceres com evolução rápida, tais como linfomas.

Splicing alternativo do mRNA

No capítulo 32, o conceito de *splicing* do transcrito inicial ou pré-mRNA foi introduzido. Muitos pré-mRNAs podem ser processados de formas alternativas e esse processo, que se estima afetar 30%-40% dos genes humanos, pode fornecer a diversidade suficiente para explicar a singularidade individual, a despeito das similaridades do complemento gênico de uma espécie. Portanto, através do *splicing* alternativo, um éxon em particular ou alguns éxons alternativos podem ser retirados em algumas, mas não em todas as ocasiões. Uma vez que a maioria dos genes tem vários éxons (a média é de cerca de sete), alguns pré-mRNAs podem por fim originar muitas versões diferentes do mRNA e, da mesma forma, da proteína final. As proteínas podem diferir por apenas alguns poucos aminoácidos ou podem ter diferenças importantes e essas frequentemente têm funções biológicas distintas. Por exemplo, se um éxon é ou não deletado pode afetar a localização da proteína na célula, se uma proteína permanece na célula ou é secretada, se existem isoformas específicas no músculo esquelético *versus* cardíaco. O *splicing* alternativo pode também produzir uma proteína truncada que pode inibir a função da proteína íntegra. O *splicing* alternativo é regulado, de maneira que certas formas resultantes do *splicing* só podem ser vistas em certas células ou tecidos, em certos estágios de desenvolvimento ou sob certas condições. No cérebro humano, existe uma família de proteínas de adesão de superfície celular, as neurexinas, que medeiam a complexa rede de interações entre aproximadamente 10^{12} neurônios. As neurexinas estão entre os maiores genes humanos e centenas, talvez milhares, de isoformas de neurexinas são geradas de somente três genes por promotores e *splicing* alternativos, fornecendo uma gama variada de comunicações intercelulares necessárias para o desenvolvimento das sofisticadas redes neurais. As neurexinas provavelmente têm um conjunto igualmente complexo de isoformas de ligantes, fornecendo uma tremenda flexibilidade de interações celulares reversíveis durante o desenvolvimento do sistema nervoso central.

SPLICING ALTERNATIVO E EXPRESSÃO tecido-ESPECÍFICA DE UM GENE: UMA MENINA COM UM INCHAÇO NO PESCOÇO

Uma menina de 17 anos de idade notou um inchaço do lado esquerdo de seu pescoço. Fora isso, ela estava bem, mas tanto sua mãe quanto seu tio materno se submeteram à remoção de tumores adrenais. Seu sangue foi coletado e enviado ao laboratório para medida de calcitonina, que estava fortemente aumentada. A patologia da massa de tireoide excisada confirmou o diagnóstico de carcinoma medular da tireoide. Essa família tem uma mutação genética causando a condição conhecida como neoplasia endócrina múltipa tipo 2A (MEN 2A). A MEN 2A é uma síndrome de câncer autossômica dominante de alta penetrância causada por uma mutação na linhagem germinativa do proto-oncogene RET. Cerca de 5%-10% dos cânceres resultam de mutações na linhagem germinativa, mas mutações somáticas adicionais são necessárias para o desenvolvimento do câncer.

Comentário. A expressão do gene da calcitonina fornece um exemplo de como diferentes mecanismos podem regular a expressão gênica e originar produtos gênicos tecido-específicos que têm muitas atividades diferentes. O gene da calcitonina consiste em cinco éxons e usa dois sítios alternativos de sinalização de poliadenilação. Na glândula tireoide, as células C medulares produzem calcitonina usando um sítio de sinalização de poliadenilação associado ao éxon 4 para transcrever

um pré-mRNA compreendendo os éxons 1-4. Os íntrons associados são retirados e o mRNA é traduzido para produzir calcitonina; a calcitonina elevada é diagnóstico para esta doença. Entretanto, no tecido neural, um segundo sítio de sinalização de poliadenilação próximo ao éxon 5 é utilizado. Isso resulta em um pré-mRNA compreendendo todos os cinco éxons e seus íntrons intermediários. Esse pré-mRNA maior é então processado e, além de todos os íntrons, o éxon 4 é também retirado, deixando um mRNA composto pelos éxons 1-3 e 5, que é, então, traduzido em um potente vasodilatador, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP).

Edição do RNA ao nível pós-transcricional

A edição do RNA envolve a sua alteração mediada por enzima antes da tradução. Esse processo pode envolver a inserção, deleção ou conversão de nucleotídeos na molécula de RNA. Como o *splicing* alternativo, a substituição de um nucleotídeo por outro pode resultar em diferenças tecido-específicas dos transcritos. Por exemplo, *APOB*, o gene da apolipoproteína B humana (apoB), um componente da lipoproteína de baixa densidade, codifica um transcrito de mRNA de 14,1 kb, no fígado, e um produto proteico com 4.536 aminoácidos, a apoB100 (Cap. 18). No entanto, no intestino delgado, o mRNA é traduzido em um produto proteico, chamado apoB48, que tem 2.152 aminoácidos (aproximadamente 48% de 4.536), com aminoácidos idênticos aos primeiros 2.152 aminoácidos da apoB100. A diferença no tamanho da proteína ocorre porque, no intestino delgado, o nucleotídeo 6666 é "editado" pela desaminação de um único resíduo de citidina, convertendo-o em um resíduo de uridina. A mudança resultante, de uma glutamina para um códon de parada, causa o término prematuro, produzindo apoB48 no intestino (Fig. 34.7). Além desta citidina desaminase, existem outras enzimas que modificam outros mRNAs antes da tradução, tais como as ADARs (*a*denosina *d*esaminases que *a*tuam sobre o *R*NA). A ADAR2 modifica o mRNA do receptor de glutamato, o que resulta na mudança de um único aminoácido necessário para a função do receptor, e embora se saiba que outra enzima, a ADAR1, seja essencial em ratos, seus substratos são desconhecidos.

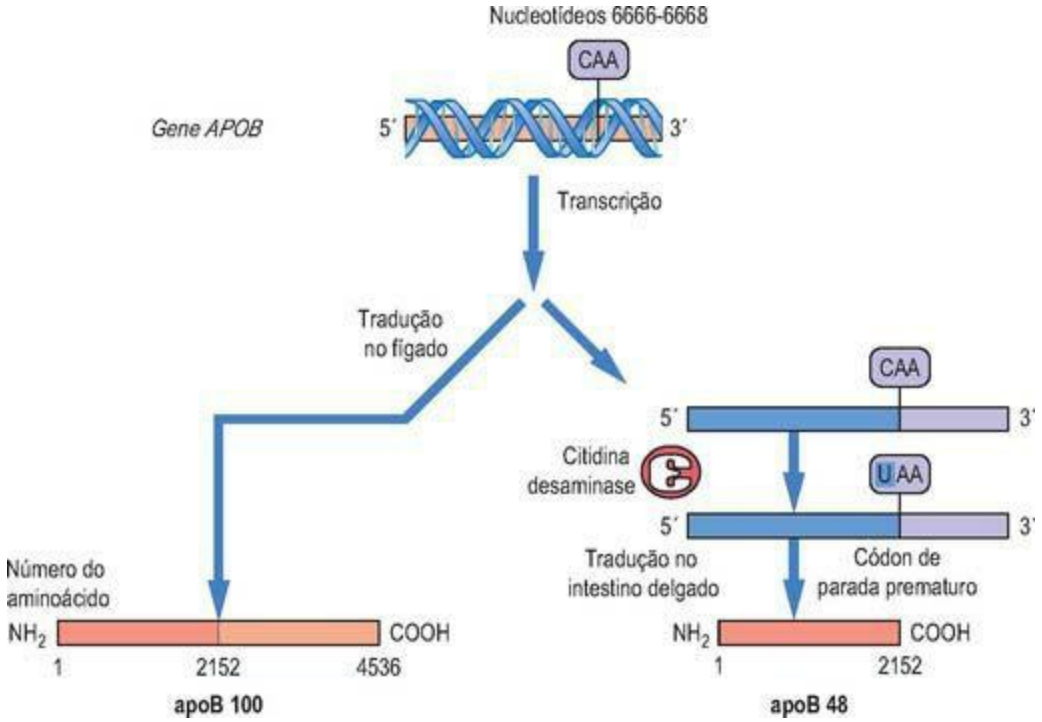


Fig. 34.7 Edição do RNA do gene *APOB* em seres humanos origina transcritos tecido-específicos. No intestino delgado, o nucleotídeo 6666 do mRNA de apoB é convertido de uma citosina em uracil pela ação da enzima citidina desaminase. Essa mudança converte um códon da glutamina no mRNA de apoB100 em um códon de parada prematuro e quando o mRNA é traduzido, o produto truncado, apoB48, é produzido (Cap. 18).

O *STATUS* DE FERRO REGULA A TRADUÇÃO DE UMA PROTEÍNA

TRANSPORTADORA DE FERRO: UM HOMEM OFEGANTE E FATIGADO

Um homem caucasiano com 57 anos de idade consultou seu médico de família com falta de ar e fadiga. Ele notou que sua pele estava mais escura. A avaliação clínica indicou falha cardíaca com comprometimento da função ventricular esquerda como resultado de carêdiomiopatia dilatada, uma concentração sérica baixa de testosterona e uma concentração elevada de glicose em jejum. A concentração de ferritina sérica estava bastante aumentada, > 300 μg/L, e suspeitou-se do diagnóstico de hemocromatose hereditária. O homem foi tratado por flebotomia regular até sua ferritina sérica ser < 20 μg/L, ponto no qual o intervalo da flebotomia foi aumentado para manter a concentração de ferritina sérica em valores < 50 μg/L.

Comentários. Em condições de excesso de ferro, por exemplo, na hemocromatose, existe um aumento da síntese de ferritina, uma proteína de ligação e armazenamento do ferro. Ao contrário, em condições de deficiência de ferro existe um aumento da síntese da proteína receptora de transferrina, que está envolvida na internalização do ferro. Em ambos os casos, as moléculas de RNA estão inalteradas, e não existe mudança na síntese dos respectivos mRNAs. Entretanto, tanto o mRNA da ferritina quanto o mRNA do receptor da transferrina contêm uma sequência específica conhecida como elemento de resposta ao ferro (IRE). Uma proteína específica de ligação ao IRE pode se ligar ao mRNA. Em deficiência de ferro, a proteína de ligação ao IRE se liga ao mRNA da ferritina, impedindo a tradução da ferritina, e se liga ao mRNA do receptor da transferrina e impede sua degradação. Portanto, em deficiência de ferro, as concentrações de ferritina são baixas e as concentrações de receptor de transferrina são altas. Em estados de excesso de ferro, o processo inverso ocorre, e a tradução do mRNA de ferritina aumenta, enquanto o mRNA do receptor da transferrina sofre degradação, as concentrações de ferritina sérica são altas, e as concentrações do receptor de transferrina são baixas (Fig. 34.8). Cerca de 10% da população dos Estados Unidos é portadora do gene da hemocromatose hereditária, mas somente homozigotos são afetados com a doença. Veja também o quadro da pág. 299).

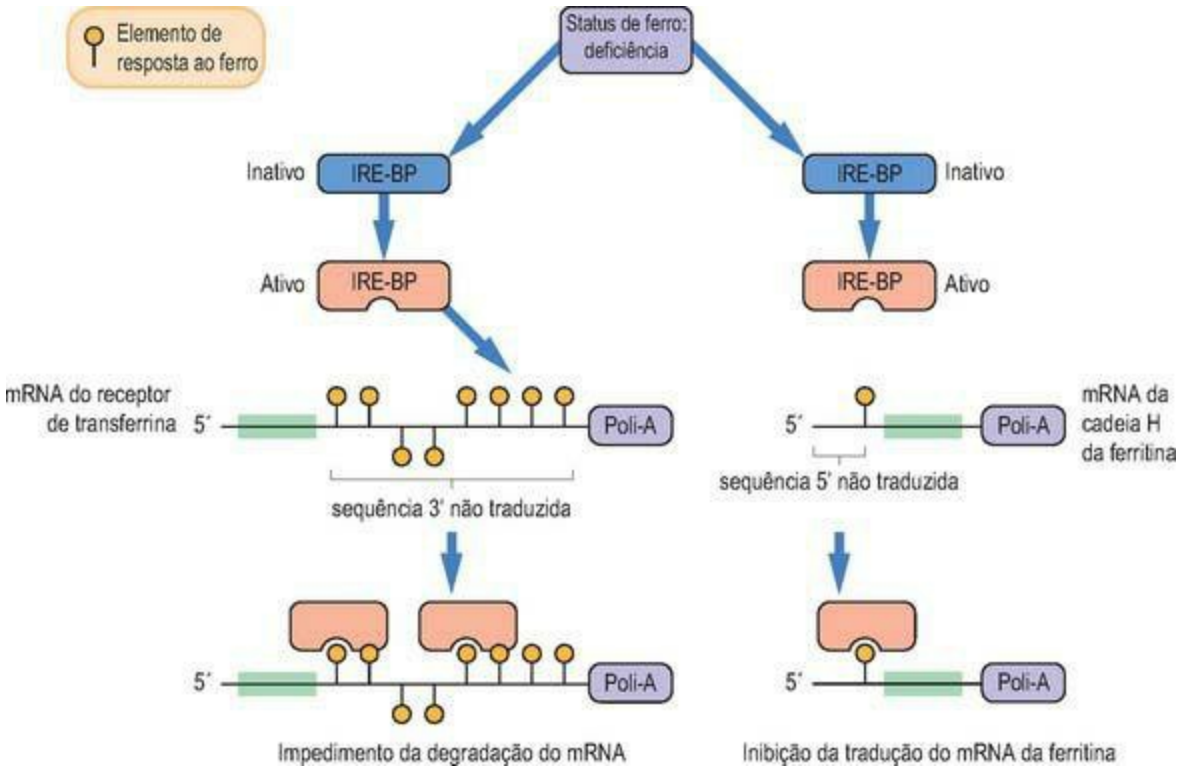


Fig. 34.8 Regulação da tradução do mRNA por *status* de ferro. A ligação de uma proteína de ligação específica ao elemento de resposta ao ferro (IRE) do mRNA de genes que respondem ao ferro pode alterar a tradução do mRNA em proteínas funcionantes de diferentes maneiras. Quando o ferro é deficiente, a proteína que se liga ao elemento de resposta ao ferro (IRE-BP) é ativada e pode se ligar ao terminal 3′ do mRNA do receptor de transferrina. Isso impede a degradação do mRNA e, portanto, aumenta a quantidade de receptor de transferrina que pode ser feito (*esquerda*) e, assim, aumenta a quantidade de ferro que o receptor pode entregar para a célula. Entretanto, a IRE-BP também se liga ao terminal 5′ do mRNA da ferritrina e impede sua tradução (*direita*). A ferritina é uma proteína que sequestra e armazena ferro no citoplasma, e uma quantidade menor é necessária em momentos de deficiência de ferro (compare com a Figura 22.8).

RNA de interferência

O RNA de interferência (RNAi), discutido rapidamente no capítulo 32, é outra maneira de controlar a expressão gênica. No centro dos RNAis estão os RNAs não codificadores muito pequenos (ncRNAs), com cerca de 20-30 nucleotídeos, um grupo dos chamados micro RNAs (miRNAs). Esses estão envolvidos na atenuação ou repressão da tradução por ligação ao 3′ UTR de um mRNA e fatores de recrutamento que inibem a síntese de proteína, ou pela destruição do mRNA por uma via alternativa. Tem sido mostrado que certos estados patológicos, tais como o câncer, mudam o padrão de expressão do miRNA nas células, alterando, assim, a expressão gênica, de forma que pode favorecer a proliferação. O RNAi representa uma grande promessa no tratamento de doenças humanas, onde a inibição da expressão de um produto gênico ou a destruição do RNA seria terapêutica, tal como nas infecções virais ou no câncer.

Ativação preferencial de um alelo de um gene

O complemento normal dos cromossomos humanos compreende 22 pares de autossomos e dois cromossomos sexuais. Em cada um dos pares de autossomos, os genes estão presentes em ambos os cromossomos: eles são bialélicos. Em condições normais, ambos os genes são expressos sem que seja dada preferência para um ou outro alelo do gene – isto é, ambas as cópias paterna e materna do gene podem ser expressas, a menos que exista uma mutação em um alelo que impeça que isto aconteça.

A situação com respeito aos cromossomos sexuais é levemente diferente. Os cromossomos sexuais são de dois tipos, X e Y, o X sendo substancialmente maior do que o Y. As mulheres têm dois cromossomos X, enquanto os homens têm um cromossomo X e um cromossomo Y. Uma região do cromossomo Y é idêntica a uma região do cromossomo X, mas o cromossomo X também contém genes que não têm um par correspondente no cromossomo Y, e alguns genes no cromossomo Y são específicos para o cromossomo Y, por exemplo, SRY, um gene determinante do sexo. Tais genes são denominados monoalélicos; eles não oferecem opção sobre que alelo do gene será expresso.

Além dos casos específicos dos cromossomos sexuais, parece não haver razão para que ambos os alelos de um gene não possam ser expressos. Entretanto, em seres humanos, os genes bialélicos têm sido identificados, mas somente um alelo – materno ou paterno – é preferencialmente expresso, a despeito do fato de ambos serem perfeitamente normais ou idênticos. Como resultado, somente 50% do produto gênico é produzido, mas o produto é funcionalmente ativo. Três diferentes mecanismos têm sido identificados que podem restringir a expressão dos genes bialélicos em seres humanos (Tabela 34.2).

Tabela 34.2 Exemplos de tipos de restrição de genes bialélicos em seres humanos. Para alguns genes, embora os dois alelos existam em qualquer célula em particular, somente um desses alelos é ativo. Portanto, o gene se comporta como se fosse monoalélico, embora de fato seja bialélico.

Restrição da expressão de genes bialélicos	
Imprinting genômico	nos genes autossômicos, o *imprinting* pode ser tecido-específico – expressão monoalélica em alguns tecidos, bialélica em outros. Exemplos induem o fator de crescimento 2 semelhante à insulina (IGF-2) e o gene de suscetibilidade ao tumor deWilms (WT1)
	produção teddo-específica de um único produto alélico, por

Exdusão alélica	exemplo, a síntese de uma única cadeia leve ou pesada de imunoglobulina, em uma célula B, a partir de apenas um alelo
Inativação do cromossomo X	alguns genes no cromossomo X em mulheres. Os homens exibem somente um alelo do gene X ligado, mas as mulheres tên dois, e um é inati-vado por repressão de aproximadamente todo o cromossomo X

O PROJETO GENOMA HUMANO

Os objetivos do Projeto Genoma Humano Internacional incluíram a construção de um mapa genético, a identificação de todos os genes humanos, e o sequenciamento do genoma inteiro, com exceção de poucas regiões excepcionalmente difíceis, tais como telômeros e centrômeros, que contêm sequências altamente repetitivas. Os resultados preliminares das sequências do genoma humano foram apresentados pela colaboração Projeto Genoma Humano Internacional e Celera Genomics, em 2001. A disponibilidade de uma sequência de referência completa do genoma humano foi anunciada pelo Projeto Genoma Humano em Abril de 2003, exatamente poucos dias antes do 50° aniversário do artigo de Watson e Crick, no qual foi primeiramente descrita a estrutura de dupla hélice do DNA. Esta sequência referência contém aproximadamente 2,9 bilhões de pares de bases e representa mais de 90% dos quase 3,2 bilhões de pares de bases do genoma humano.

O conhecimento da sequência do genoma humano tem sido importante por vários motivos, incluindo a identificação de alterações genéticas associadas a doenças. Também resultou em algumas surpresas: por exemplo, parece existir menos genes do que se supunha originalmente. Isso nos leva a questionar porque o número de genes não aumenta em organismos mais complexos tanto quanto poderia se esperar. Parte da explicação pode ser a frequência com que os transcritos de RNA sofrem *splicing* alternativo, de forma que o mesmo gene pode originar diferentes mRNAs. Estima-se que entre 30% e 40% dos genes humanos podem ser capazes de originar mRNAs diferencialmente processados e, portanto, codificar mais do que uma proteína por gene. Além disso, o complexo controle por centenas de fatores de transcrição habilita as células a expressarem números expressivos de combinações distintas de genes, e as diferenças sutis entre essas combinações podem resultar na enorme complexidade ao nível celular e ao nível de organismo (Cap. 36).



INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

Os homens têm um cromossomo X, enquanto as mulheres têm dois. Portanto, os genes no cromossomo X são bialélilcos nas muêlheres, mas monoalélicos nos homens. Nas mulheres, entretanto, um dos cromossomos X em cada célula é inativado em um estágio inicial da embriogênese. O X inativado pode ser o cromossomo X herdado do pai ou da mãe; para qualquer célula em particular, a inativação é ao acaso, mas os descendentes dessa célula terão o mesmo X inativado. Entretanto, o cromossomo X inativado pode ainda expressar alguns genes, incluindo o XIST (transcrito específico do X inativo-Xi), que codifica um RNA que desempenha uma função importante na inativação do cromossomo X. A metilação das ilhas CpG ocorre na maioria dos genes do cromossomo inativado e isto reprime a transcrição. O cromossomo X inativado é reativado durante a ovogênese nas mulheres.

Resumo

O controle da expressão gênica envolve ambos os eventos transcricionais e pós-transcricionais que regulam a expressão de um gene tanto no tempo quanto no espaço e em resposta a inúmeros sinais de desenvolvimento, hormonal e de estresse. As sequências de DNA e as proteínas que se ligam ao DNA controlam a expressão gênica. As sequências de DNA incluem os promotores de ação *cis*, tais como o TATA box, e os acentuadores e elementos de resposta. As proteínas de ligação ao DNA são fatores de transcrição de ação *trans* que se ligam com alta especificidade a essas sequências, e facilitam a ligação e o posicionamento da RNAPol II para a síntese de pré-mRNA. Outros fatores que afetam a conversão do gene em proteína envolvem o acesso do aparato transcricional ao gene, a modificação enzimática de histonas e nucleotídeos no DNA, fatores que realizam o *splicing* alternativo de íntrons, edição pós-transcricional do pré-mRNA, RNA de interferência, e expressão restrita de genes bialélicos.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Como os elementos de resposta a esteroides são identificados no genoma? Discuta as consequências de uma mutação em um SRE *versus* uma mutação na proteína que se liga ao SRE.

2. Quais são as consequências bioquímicas da edição do gene *APOB* em seres humanos? Compare os efeitos da edição ao se introduzir uma substituição, em comparação a uma inserção ou uma deleção, em uma molécula de mRNA.

3. Alguns genes têm promotores que não têm TATA box (genes sem TATA). Sem este box, o que determina onde o complexo RNAPol II iniciará a transcrição?

4. Compare o número total de genes com o número de proteínas traduzidas que podem ser sintetizadas pelo genoma humano. Que fração dos genes codifica os fatores de transcrição? Compare a concentração dos fatores de transcrição à concentração de enzimas glicolíticas na célula.

Leituras sugeridas

Berkhout B, Jeang KT. RISCy business: microRNAs, pathogenesis, and viruses. *J Biol Chem.* 2007;282:26641-26645.

Brena RM, Costello JF. Genome-epigenome interactions in cancer. *Hum Mol Genet*. 2007;16:R96-105.

C-Y Chu, TM Rana. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Phys*. 2007;213:412-419.

Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons learned from large-scale biology. *Science*. 2003;300:286-290.

Glaser KB. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. *Biochem Pharmacol*. 2007;74:659-671.

Hochheimer A, Tjian R. Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes Dev*. 2003;17:1309-1320.

International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.

Li Q, Lee J-A, Black DL. Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nature Rev Neurosci*. 2007;8:819-831.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291:1304-1351.

Zhou J, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*. 2005;70:407-417.

Sites

Epigenética Epigenética. http://epigenetica.blogspot.com/.

Human Genoma Research Institute. www.genome.gov.

Fontes sobre doenças genéticas Fontes sobre doenças genéticas. www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/.

Catálogo das doenças genéticas Catálogo das doenças genéticas. www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim.

Divisão alternativa Divisão alternativa:

- http://hazelton.lbl.gov/~teplitski/alt/
- http://www.ebi.ac.uk/asd/

Não codificação Não codificação do RNA:

- http://biobases.ibch.poznan.pl/ncRNA/
- http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml

Edição do RNA. http://dna.kdna.ucla.edu/rna/index.aspx.

Interferência do RNA:

- www.rnaiweb.com/
- www.pbs.org/wgbh/nova/sciencenow/3210/02.html

Imprinting *Imprinting* genômico. www.geneimprint.org/.

Tecnologia do DNA Recombinante

W.S. Kistler

R.G. Best

A. Jamieson

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Explicar as bases químicas da hibridização de ácidos nucleicos, incluindo o papel das sondas e sequências-alvo nos ensaios de hibridização.
- Descrever o que significa o "par de oligonucleotídeos iniciadores" utilizado em ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR), e explicar como a sequência desses iniciadores determina o produto amplificado no processo de PCR.
- Descrever as características das endonucleases de restrição, incluindo a natureza do sítio de clivagem no DNA e os tipos de extremidades dos fragmentos gerados.
- Descrever as etapas gerais utilizadas para a realização de Southern blot e o tipo de informação gerada por este ensaio.
- Diferenciar um cDNA de um clone genômico.
- Descrever as características típicas de um plasmídeo bacteriano usado para a clonagem de DNA.
- Descrever os usos da hibridização e da tecnologia de PCR para a análise do genoma humano para fins forenses, genéticos e de diagnóstico.

INTRODUÇãO

Existem várias características-chave para todos os testes de DNA

Paralelamente ao desenvolvimento da nossa compreensão sobre DNA, genes e suas funções, ocorreu a explosão de tecnologias aplicadas a análises clínicas do DNA e do RNA. Uma descrição completa de todos esses processos não faz parte do escopo deste capítulo, mas o entendimento dos princípios básicos dos métodos e a apresentação de exemplos de algumas aplicações comumente usadas são essenciais para se entender como se interpreta as análises do DNA em laboratórios forenses, genéticos e de diagnóstico em um contexto clínico. Existem vários aspectos-chave comuns a todos os métodos de análise do DNA atualmente utilizados e estes serão discutidos antes de se abordar algumas das técnicas comumente empregadas.

HIBRIDIZAÇãO

A hibridização é baseada nas propriedades de anelamento do DNA

A hibridização é um aspecto fundamental da tecnologia do DNA. É um processo pelo qual um fragmento de DNA ou RNA de sequência nucleotídica conhecida, variando de um tamanho tão pequeno quanto 15 pares de bases (pb) a várias centenas de quilobases, é usado para identificar uma região ou um fragmento de DNA contendo sequências complementares. O primeiro fragmento de DNA ou RNA é chamado sonda. A sonda de DNA formará um par de bases com outra fita de DNA, frequentemente denominada alvo, desde que as duas fitas sejam complementares e um número suficiente de pontes de hidrogênio seja formado.

Os princípios da hibridização molecular

Na hibridização molecular, é essencial que a sonda e o alvo sejam inicialmente fitas simples

As sondas podem variar tanto em tamanho quanto em natureza (Tabela 35.1). No entanto, uma característica essencial de qualquer reação de hibridização é que a sonda e o alvo devem estar livres para formar pares de bases um com o outro. O processo de separação de duas fitas de DNA é chamado desnaturação do DNA ou *DNA melting*. Dependendo do tipo de reação de hibridização, sondas e alvos podem ser desnaturados por diferentes métodos, por exemplo, altas temperaturas (80°C-100°C), condições alcalinas ou exposição a altas concentrações de ureia ou formamida. Uma vez estando a sonda e o alvo como fitas simples, a mistura dos dois em condições que favoreçam a formação de uma hélice dupla fita permitirá que bases complementares se recombinem. Esse processo é chamado anelamento ou reassociação do DNA, e quando uma fita da sonda reage com uma fita-alvo é formado um complexo denominado heteroduplex.

Tabela 35.1 Características de algumas sondas de ácidos nucleicos usadas em estudos de hibridização.

Tipo de sonda	Origem	Características da sonda	Método de marcação
DNA	DNA originado de células: clonagem, reação em cadeia da polimerase (PCR)	dupla fita de origem celular: 0,1- >100 kb dupla fita originada de PCR: 0,1- 10 kb	*nick translation* (transferência de entalhe), com iniciadores randômicos
RNA	transcrição de RNA de vetores, como fagos	fita simples: 1-2 kb	transcrição *run-off*
Oligonucleotídeo	síntese química	fita simples: 15-50 nucleotídeos	marcação da extremidade

A formação de heteroduplexes sonda-alvo é essencial para a aplicação da hibridização molecular

As condições nas quais a hibridização do DNA ocorre, a confiabilidade e a especificidade ou estringência de uma hibridização são afetadas por diversos fatores:

- **composição de bases:** os pares GC apresentam três pontes de hidrogênio, enquanto os pares AT apresentam duas. O DNA de fita dupla com um alto teor de GC é, portanto, mais estável e apresenta uma maior temperatura de desnaturação (T_m – *melting temperature*);

- **comprimento da fita:** quanto mais longa é a fita de DNA, maior é o número de pontes de hidrogênio entre as duas fitas. A desnaturação de fitas mais longas requer temperaturas mais altas ou tratamento alcalino mais forte; a estabilidade varia drasticamente com o comprimento em sondas muito curtas, mas acima de algumas centenas de pares de bases, a estabilidade é relativamente insensível ao comprimento e é determinada principalmente pela composição de bases.

- **condições de reação:** altas concentrações de cátion (normalmente Ca^+) favorecem a formação de DNA de fita dupla (porque as cargas negativas do suporte de açúcar-fosfato são protegidas umas das outras), enquanto altas concentrações de ureia ou formamida favorecem o DNA de fita simples (porque essas soluções reduzem o empilhamento de bases e podem competir pela formação de pontes de hidrogênio). Dizemos que as hibridizações são realizadas em "baixa estringência" quando as condições são favoráveis à formação de duplex, e em "alta estringência" quando os duplexes são

apenas levemente mais estáveis do que as moléculas de fita simples.

Assim, com uma seleção apropriada de condições (alta estringência), uma sonda curta de 30-50 pb pode requerer um perfeito emparelhamento para formar um híbrido estável com o seu alvo. Por sua vez, em condições de "baixa estringência" uma sonda mais longa, por exemplo, 500 pb, pode reagir com alvos que contenham múltiplos nucleotídeos malpareados (Fig. 35.1).

A – Características de hibridização usando uma sonda longa convencional (> 200 bases)

Pareamento	Perfeita	Pareamento incorreto de uma única base	Pareamento incorreto de múltiplas bases
Estringência	Alta	Intermediária	Baixa
Exemplo	Alvo humano + sonda humana	Alvo humano + sonda humana com mutação	Alvo humano + sonda de camundongo
Estabilidade	Estável	Estável	Estável

B – Características de hibridização usando uma sonda de oligonucleotídeo pequena

Pareamento	Perfeita	Pareamento incorreto de uma única base	
Estringência	Alta	Alta	
Exemplo			
Estabilidade	Estável	Instável	

Fig. 35.1 Hibridização sonda-alvo. (A) Sondas longas, por exemplo, 200 bases ou mais, podem formar heteroduplex estáveis com o DNA-alvo mesmo que existam um número significativo de bases não complementares em condições de baixa estringência. (B) Sondas de oligonucleotídeos, ao contrário, podem discriminar alvos que diferem em uma única base sob condições estringentes.

A estabilidade de um duplex de ácido nucleico pode ser estimada pela determinação de sua temperatura de desnaturação (T_m)

A temperatura de desnaturação (T_m) é a temperatura, in vitro, na qual 50% de um duplex fita dupla está dissociado em fitas simples. Para sondas de DNA relativamente longas, a T_m é determinada principalmente pela composição de bases, com o DNA rico em AT desnaturando a uma temperatura menor do que o DNA rico em GC. Em humanos e outros mamíferos, o conteúdo médio de GC é em torno de 40%, e a temperatura de desnaturação em condições moderadas de sal é de aproximadamente 87°C. Para os oligonucleotídeos pequenos, como os oligonucleotídeos iniciadores usados em reações em cadeia da polimerase (a seguir), efeitos de comprimento, composição e até mesmo de várias sequências de dinucleotídeos devem ser levados em consideração. Isso porque o DNA de fita dupla é estabilizado pelo grau de sobreposição das bases empilhadas dos sucessivos nucleotídeos, e isso varia dependendo do nucleotídeo específico adjacente a uma base em particular. Programas de computação estão amplamente disponíveis para predizer os valores de T_m (ver Sites ao final do capítulo).

As sondas devem ter uma marcação para ser identificadas

Fica implícita ao uso de sondas para identificar porções de DNA complementar a noção que, caso a hibridização ocorra, o heteroduplex possa ser detectado de forma específica. Assim, a sonda é marcada de forma que o duplex sonda-alvo possa ser identificado. Existem várias formas pelas quais a sonda pode ser marcada, mas todas se encaixam em duas categorias, a isotópica, envolvendo, por exemplo, átomos radioativos, ou a não isotópica, como sondas marcadas nas extremidades com fluorescência ou pequenas moléculas ligantes (Tabela 35.2).

Tabela 35.2 Detalhes de marcadores utilizados para preparar sondas usadas para hibridização de ácidos nucleicos. *dNTP, desoxirribonucleotídeo trifosfato.*

Marcadores utilizados no preparo de sondas empregadas na hibridização de ácidos nucleicos		
Marcador da sonda	**Características**	**Exemplos**
Radioativo	utiliza radioisótopos emissores de partículas β, dNTPs são incorporados na sonda de DNA	^{32}P, ^{35}S
Não radioativo	depende da ligação de uma molécula repórter a um nucleotideo precursor, por exemplo, um dNTP. Quando a sonda hibridiza, uma outra proteina com alta afinidade peló grupo repórter (um grupo de afinidade que tenha um grupo marcador associado) se liga ao repórter e o complexo ligado pode ser detectado	biotina e estreptavidina, digoxigenina

Muitas técnicas que envolvem hibridização e marcação de sondas ainda envolvem o uso de radioisótopos, tais como ^{32}P, ^{35}S ou ^{3}H, e dessa forma requerem um método para detectar e localizar a radioatividade. O método mais comum consiste no processo de autorradiografia. A autorradiografia permite que a informação de uma fase sólida, amostras em gel ou fixadas em tecidos, por exemplo, possa ser detectada e armazenada em uma forma bidimensional como uma imagem fotográfica.

Métodos utilizados na marcação de sondas de nucleotídeos

Marcação de sondas de DNA ou RNA

Tanto o DNA quanto o RNA podem ser marcados in vitro por várias técnicas que incorporaram um nucleotídeo(os) marcado(s) na estrutura da sonda. Existem três formas gerais pelas quais o DNA pode ser marcado *in vitro:*

- **Marcação da extremidade:** técnicas enzimáticas estão disponíveis para adicionar marcadores radioativos à s extremidades 5′ e 3′ das fitas individuais nos DNAs duplex. Um modo simples de fazer isto emprega a polinucleotídeo quinase. Esta enzima transferirá o γ-fosfato terminal do ATP para um grupo 5′-hidroxila livre da extremidade de uma molécula de fita simples ou dupla. Essa técnica, usando [γ-^{32}P] dATP, é uma boa maneira de marcar oligonucleotídeos, mas a sensibilidade é limitada porque apenas um único ^{32}P pode ser introduzido em uma fita longa de DNA.

- **Marcação baseada na polimerase:** usando uma DNA polimerase, múltiplos nucleotídeos marcados são incorporados na sonda durante a síntese de DNA *in vitro*. A radioatividade é normalmente fornecida como um dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatos marcados no fosfato posicionado mais internamente (α). Quando um fragmento de DNA é aquecido na presença de uma mistura de sequências randômicas de hexanucleotídeos e a temperatura é diminuída, os hexanucleotídeos parearão em vários locais ao acaso e proporcionarão pontos de início (oligonucleotídeos iniciadores) para a extensão por uma DNA polimerase. Desta maneira, até 25% dos nucleotídeos introduzidos carregarão a marca de radioatividade (Fig. 35.2).

- ***Nick translation*** **(transferência de entalhe)** de DNA: *nick translation* é uma técnica alternativa de introduzir nucleotídeos marcados ao longo de uma sonda de DNA. Neste caso, um pequeno número de quebras do tipo fita simples no suporte fosfodiéster (conhecidas por *"nicks"* – "entalhes") é introduzido por uma enzima, como a DNaseI pancreática, que deixa expostos um grupo 3′-OH e um -5′-fosfato. Se a DNA polimerase I de *E. coli* for, então, adicionada junto com um α-^{32}P[dNTP] e os outros três dNTPs não marcados, a enzima degradará o DNA quebrado na direção 5′-3′, enquanto usa sua atividade de polimerase para substituir os mesmos nucleotídeos na mesma direção. Isto é possível somente com a DNA polimerase I, devido a sua capacidade única de tanto degradar DNA de fita dupla na direção 5′-3′ quanto simultaneamente polimerizar novos nucleotídeos atrás dela na mesma direção. Dessa maneira o *"nick"* original é movido (transferido) ao longo da molécula de DNA, presumivelmente até que a polimerase atinja o final da fita.

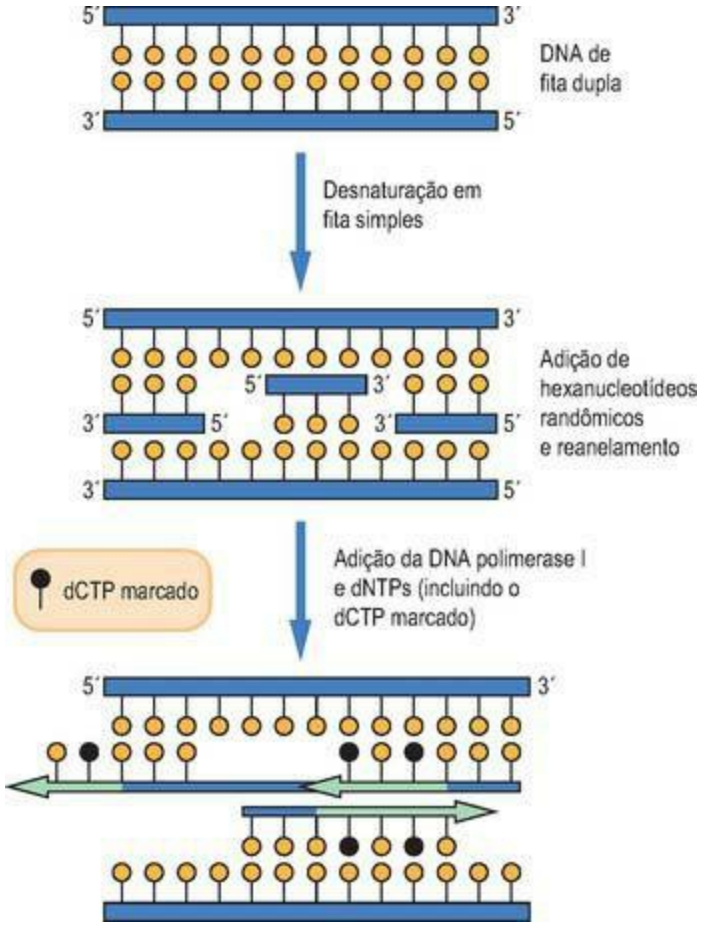


Fig. 35.2 Marcação randômica com iniciadores de sondas de DNA. Hibridização randômica de hexanucleotídeos com um molde permite que o fragmento Klenow da DNA polimerase I de *E. coli* preencha os espaços, incorporando dCTP radioativo para criar fitas complementares de DNA radioativas.

AUTORRADIOGRAFIA

Por muitos anos uma técnica de imagem comumente empregada tem sido a autorradiografia direta, a qual envolve a exposição da amostra em contato direto com o material fotográfico, geralmente um filme de raio X. A radioatividade da sonda ligada produz uma imagem escura no filme revelado. O ^{32}P é um marcador comumente utilizado em sondas de ácidos nucleicos por causa de sua alta atividade específica. As partículas β emitidas são suficientemente energéticas para que uma fração substancial passe através de um filme comum sem que o mesmo seja exposto. Por isso, é comum usar o mesmo tipo de tela intensificadora usada clinicamente para tornar o filme mais sensível aos raios X. As partículas β energéticas passam através do filme, mas são absorvidas pela tela intensificadora, que, por sua vez, emite luz visível e expõe o filme.

O uso de enzimas de restrição para analisar o DNA genômico

Southern blots são os protótipos para métodos que usam sondas específicas de hibridização para identificar sequências no DNA genômico ou no RNA total

Uma das etapas fundamentais na evolução da biologia molecular foi a descoberta de que o DNA

poderia ser transferido de um gel semissólido para uma membrana de nitrocelulose, de forma que a membrana pudesse ser um registro permanente da informação do DNA contida no gel e pudesse ser usada em experimentos com múltiplas sondas. O processo pelo qual o DNA é transferido para a membrana foi descrito, pela primeira vez, por Ed Southern, mas técnicas subsequentes baseadas na transferência de RNA e proteínas adotaram o mesmo direcionamento temático e são denominadas Northern e Western blots, respectivamente (Tabela 35.3).

Tabela 35.3 Tipos de *blots* utilizados em biologia molecular. *Southern e Northern blots* utilizam sondas baseadas em nucleotídeos para hibridizar ao DNA ou RNA na membrana. *Western blots* dependem da capacidade de um anticorpo específico se ligar a uma proteína de interesse.

***Blots* utilizados em biologia molecula**		
Blot	**Sonda**	**Alvo**
Southern	Nucleotídeo	DNA
Northern	Nucleotídeo	RNA
Western	Anticorpo	Proteína

MICROARRANJOS

A maioria dos métodos discutidos neste capítulo permite a análise de um ou poucos genes por vez. Entretanto, a capacidade de se obter um panorama global dos genes que uma célula está expressando representaria uma grande vantagem. A tecnologia de microarranjo (Fig. 35.3) torna isso possível. Dependendo do objetivo do estudo, esses microarranjos podem avaliar apenas regiões expressas dos genes (sequências que aparecem nos mRNAs) ou podem incluir alvos do DNA de todas as frações não repetitivas do genoma. Para o estudo da expressão gênica diferencial, milhares (ou dezenas de milhares) de diferentes DNAs, cada um correspondendo a um fragmento de um gene

conhecido, são colocados em uma lâmina de maneira ordenada, de forma que a posição e a identidade de cada DNA são conhecidas. Uma sonda de DNA ou RNA marcada com um fluoróforo é, então, feita do RNA total extraído das células de interesse. Diferentes fluoróforos podem ser incorporados, assim, pode-se, por exemplo, utilizar uma sonda marcada em verde derivada de células tumorais e uma sonda marcada em vermelho derivada de células normais do tecido normal adjacente do mesmo indivíduo. As duas sondas marcadas com fluoróforos diferentes são misturadas, hibridizadas com o DNA na lâmina, e as sondas não hibridizadas são retiradas por lavagem. Em seguida, a lâmina pode ser analisada utilizando-se um instrumento que detecta cada uma das sondas separadamente em seus diferentes comprimentos de onda de fluorescência. Se um gene for expresso somente no RNA tumoral, a marcação correspondente à quele gene será verde. Se o gene for expresso apenas no tecido normal, a marcação será vermelha. Se o gene é expresso igualmente em ambos os RNAs, a marcação será amarela (a soma das fluorescências vermelha e verde). Os resultados são analisados e a expressão relativa nas amostras de tumor e de controle em cada um dos DNAs do arranjo pode ser determinada. Assim, podem-se detectar diferenças na expressão de alguns genes (dentre os milhares no arranjo) que se correlacionam com um estágio ou outra condição de uma determinada doença. Esta é uma maneira poderosa e rápida de se determinar como uma população de células, tal como células doentes, diferem de outras células quanto ao nível de expressão de RNA. A mesma tecnologia pode ser aplicada para analisar diferenças na expressão gênica em resposta a sinais hormonais ou estresse ambiental.

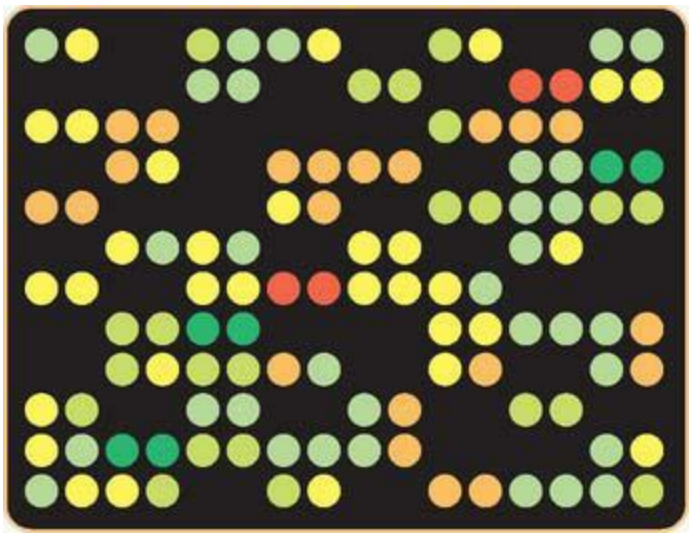


Fig. 35.3 Hibridização de microarranjo. A representação de uma pequena região de um arranjo. A sonda consistiu em uma mistura de moléculas de cDNA marcadas em verde derivadas do mRNA de células normais e moléculas marcadas em vermelho derivadas do mRNA de células doentes. A coloração e a intensidade dos pontos indicam a prevalência relativa de mRNAs específicos nas células normais, quando comparados com os de células doentes. O sinal amarelo indica que um mRNA específico foi igualmente comum tanto em células normais quanto doentes. A ausência de sinal indica genes cuja expressão não é detectável.

Microarranjos são também usados para identificar deleções e duplicações no genoma que estão associadas ao atraso no desenvolvimento, retardo mental, defeitos estruturais congênitos e síndromes genéticas contíguas. Os microarranjos genômicos (que contêm DNA-alvos distribuídos uniformemente pelos cromossomos ao invés de apenas pelas regiões codificadoras) são úteis para a detecção de anormalidades de dosagem gênica menores do que as que podem ser identificadas com a cariotipagem convencional. Quando usada para este propósito, a técnica é referida como "cariotipagem molecular". Um exemplo é a notável quantidade de variações nas sequências de DNA

entre diferentes indivíduos devido à variação do número de cópias (CNVs). Este termo descreve duplicações e deleções em regiões do DNA do tamanho de um gene (com o tamanho médio de 100-200 kb) que foram identificadas em grande quantidade nos últimos anos pelo uso de arranjos ou técnicas rápidas de sequenciamento. Algumas delas estão associadas a fenótipos clinicamente importantes, enquanto outras parecem ser completamente benignas. Elas podem ser responsáveis por um componente significativo da variação genética entre os indivíduos.



A BUSCA PELA CAUSA DOS COMPLEXOS PADRÕES DE MALFORMAÇÕES: SÍNDROME DE PRADER-WILLI

Uma criança é levada ao seu pediatra por causa de tônus muscular fraco, retardo no desenvolvimento e um desejo quase incontrolável de comer (hiperfagia). O histórico familar é negativo para este padrão raro de características. O médico solicita um teste citogenético molecular, hibridização in situ por fluorescência (FISH), por causa da suspeita clínica de síndrome de Prader-Willi (PWS), e descobre que uma cópia do cromossomo 15 não hibridiza com uma sonda colorida para o gene da proteína ribossomal nuclear pequena N (SNRPN) (Cap. 31).

Comentário. As microdeleções próximas ao centrômero do cromossomo 15 observadas em crianças e adultos com síndrome de Prader-Willi identificaram o gene SNRPN como uma região crítica para PWS. Esta região do cromossomo 15 é *imprinted* ("desligada") nas mulheres durante a gametogênese e, portanto, a prole saudável recebe sua única cópia funcional do pai na concepção. Se a cópia paterna do cromossomo 15 tem uma microdeleção que deleta o SNRPN, ou se ambas as cópias do cromossomo são herdadas da mãe, nenhuma cópia funcional do SNRPN é expressa no embrião em desenvolvimento/bebê, resultando em PWS.

As enzimas de restrição são essenciais na realização dos Southern blots

As endonucleases de restrição compreendem um grupo de enzimas que clivam DNA de fita dupla. Estas enzimas reconhecem sequências específicas e cada enzima age em um número limitado de sítios no DNA chamados sítios de "reconhecimento" ou "de clivagem". As endonucleases de restrição fazem parte do "sistema imune" bacteriano. As bactérias metilam o próprio DNA, protegendo-o de suas próprias enzimas de restrição, mas clivam DNAs não metilados de vírus ou de bacteriófagos infectantes em sítios específicos, inativando, assim, os vírus.

Se o DNA é digerido por uma enzima de restrição, este será reduzido a fragmentos de tamanhos variados, dependendo do número de sítios de clivagem para aquela enzima que estão presentes no DNA. É importante notar que cada enzima cortará o DNA em um conjunto único de fragmentos (Fig. 35.4). Muitas enzimas de restrição reconhecem sítios cujos tamanhos são tipicamente de quatro (p. ex., *Hae*III), seis (p. ex., EcoRI) ou oito nucleotídeos (p. ex., NotI) (Tabela 35.4). Cada enzima reconhece seu próprio sítio; a variação em um único nucleotídeo dentro da sequência de reconhecimento torna a sequência completamente resistente a uma enzima específica.

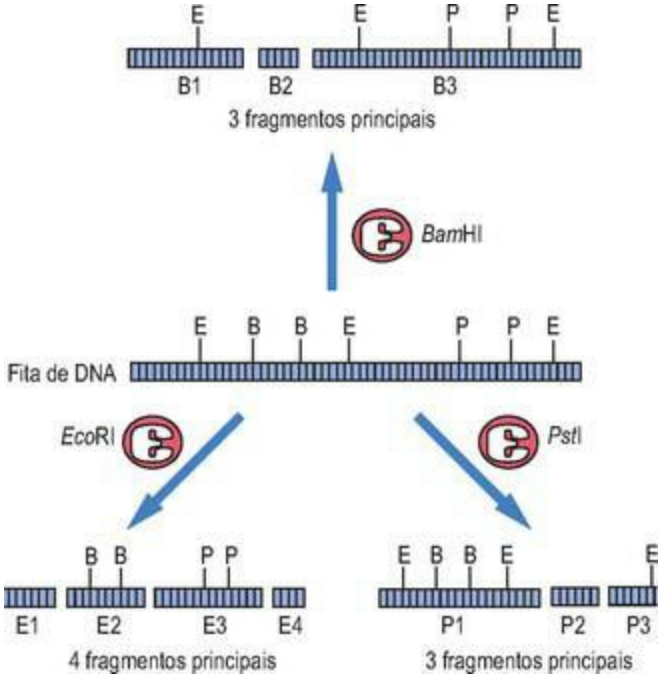


Fig. 35.4 Digestão do DNA por enzimas de restrição. A digestão de uma molécula de DNA por enzimas de restrição diferentes pode resultar em muitos fragmentos diferentes, mesmo que o tamanho aparente dos fragmentos seja similar. Por exemplo, os fragmentos E1 e P3 são de tamanhos semelhantes mas são pedaços do DNA claramente diferentes. E, sítio para *Eco* RI, B, sítio para *Bam* HI; P, sítio para *Pst* l

Tabela 35.4 Endonucleases de restrição comumente utilizadas. As enzimas podem clivar o DNA e produzirem "extremidades cegas" em que o DNA é cortado „verticalmente", deixando duas extremidades que não apresentam nucleotídeos em fita simples. No entanto, se o DNA é clivado de forma „oblíqua", a molécula apresentará pequenas sequências de fita simples em suas extremidades. Estas extremidades são conhecidas como "coe-sivas" porque se ligarão (hibridizarão) seletivamente a outras extremidades coesivas complementares. Os sítios de clvagem do DNA por enzimas de res-trição são frequentemente descritos como palindrômicos por causa da sua simetria de repetição invertida — as fitas apresentam sequências idênticas em direções opostas nas fitas complementares.

Endonucleases de restrição		
Enzima de restrição	**Sltio de restrição**	**Extremidades**
Hae*lll*	GG*CC	Cega
	CC*GG	
*Msp*1	C*CGG	Coesiva
	GGC*C	
*E*coRV	GAT*ATC	Cega
	CTA*TAG	
*Eco**R*l	G*AATTC	Coesiva
	CTTAA*G	
*Not*l	GC*GGCCGC	Coesiva
	CG CCGG*CG	

Southern blotting

As técnicas de blotting envolvem a transferência de DNA, RNA ou proteínas da fase semissólida de um gel para uma fase sólida que pode, então, ser utilizada como molde para a exposição a uma variedade de sondas moleculares

Se o DNA é digerido por uma enzima de restrição, os produtos resultantes podem ser separados por tamanho pela eletroforese em gel. Uma solução de DNA digerido é colocada em um poço no gel de agarose, e aplica-se uma corrente elétrica. A taxa de migração dos fragmentos de DNA depende do seu tamanho: os fragmentos menores migram de forma mais rápida, e os maiores migram mais lentamente. O fracionamento baseado no tamanho ocorre porque moléculas menores de DNA podem migrar mais livremente através da matriz do gel. Moléculas de DNA de tamanho médio a grande assumem geometria em espiral aleatória, e com o aumento do tamanho têm dificuldade progressivamente maior de migração através da malha de polissacarídeos.

A eletroforese em gel de agarose é empregada para separar fragmentos que variam de 100 bases a aproximadamente 20 kb de comprimento (a resolução é mínima acima de 40 kb). Após a eletroforese, os géis são colocados em uma solução fortemente alcalina para que os fragmentos de

DNA se dissociem em fitas simples. Estes fragmentos de fitas simples podem, então, ser transferidos para uma membrana de nitrocelulose ou náilon, nas quais se ligam imediatamente, e de forma permanente caso a membrana seja preservada apropriadamente. O processo de transferência envolve a passagem de soluto através do gel e para dentro da membrana, carregando passivamente o DNA e produzindo uma imagem do gel na membrana (Fig. 35.5).

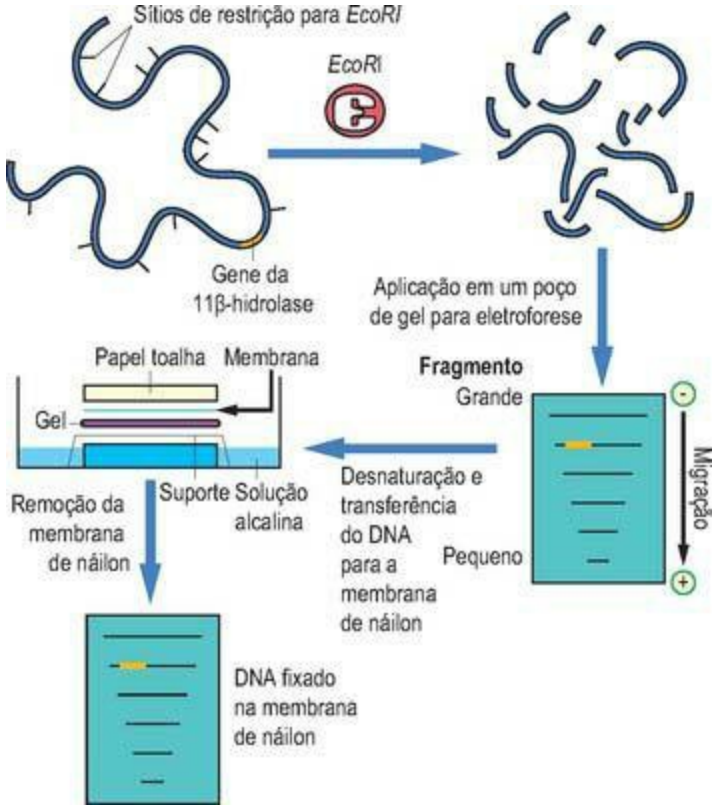


Fig. 35.5 *Southern blotting* **de DNA.** O DNA digerido por uma enzima de restrição é fracionado por tamanho pela eletroforese em agarose. O gel de agarose é, então, colocado em solução alcalina para desnaturar o DNA. O DNA de fita simples pode passar do gel para a membrana de náilon à medida que a solução tampão flui para cima por ação da capilaridade, formando um registro permanente do DNA digerido.

FREQUÊNCIA DE CLIVAGENS DE UMA ENZIMA DE RESTRIÇãO

As enzimas de restrição cortam o DNA em fragmentos nos sítios determinados pela sequência de nucleotídeos do DNA (Tabela 35.4). A frequência de sítios de clivagem para as inúmeras enzimas diferentes varia principalmente com o comprimento do sítio de reconhecimento. Para uma enzima com um sítio de reconhecimento composto de quatro bases, como a *Hae*lII, os sítios de corte deverão ocorrer ao acaso uma vez a cada sequência de 256 pares de bases. Para uma enzima com um sítio de reconhecimento composto de oito bases, como a *Not* I, os sítios de corte ocorrerão apenas uma vez em uma sequência de aproximadamente 65.000 pares de bases. Assim, as clivagens frequentes geram tipicamente um grande número de fragmentos pequenos, enquanto as clivagens raras geram fragmentos maiores e em menor número. Essas diferenças podem ser exploradas quando tentamos mapear a localização de certos genes nos cromossomos.

ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO

A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é uma técnica utilizada para separar fragmentos grandes de DNA digerido por enzimas de restrição de clivagem rara. Os fragmentos de DNA gerados por essas enzimas podem apresentar várias centenas de quilobases e não podem ser separados pela eletroforese em gel de agarose convencional. A eletroforese em gel convencional utiliza corrente aplicada em uma única dimensão (Fig. 35.5). Acredita-se que os fragmentos de DNA muito grandes se autoorientam, de forma que eles atravessam o gel como se tivessem sendo arrastados. Uma vez orientadas pela voltagem, as moléculas de diferentes comprimentos migram vagarosamente, mas com taxas similares. O truque para separar estes fragmentos grandes é fazê-los mudar de direção em intervalos regulares; os DNAs mais longos demoram mais tempo para se orientar corretamente e, assim, ficam atrasados em relação aos fragmentos menores. Portanto, na PFGE uma corrente alternada é aplicada ao gel, mudando a direção da eletroforese em intervalos. O efeito líquido da sequência de tempos e mudanças na polaridade da corrente é a separação dos fragmentos grandes por tamanho em uma dimensão. A eletroforese em gel de agarose padrão pode levar de 1 a 4 horas para terminar, enquanto a PFGE frequentemente requer mais de 24 horas para ser finalizada.

AMPLIFICAÇãO E CLONAGEM DO ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

Métodos de amplificação de DNA in vitro

A amplificação do DNA é fundamental para os estudos de biologia molecular e genética. A amplificação do DNA possibilita um aumento enorme do número de cópias de uma sequência de DNA desejada. Duas abordagens importantes para a amplificação de DNA são:

- **clonagem do DNA baseada em células:** o DNA é amplificado in vivo por um hospedeiro celular de forma que o número de cópias do DNA molde desejado aumenta simplesmente devido ao aumento exponencial do número de células hospedeiras que se replicam;

- **clonagem do DNA baseada em enzimas (livre de células):** este método é representado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e envolve a amplificação do DNA inteiramente in vitro.

Clonagem dependente de células

A maioria das clonagens dependente de células utiliza o DNA recombinante em bactérias replicativas — a insulina e a eritropoetina recombinantes humanas são produzidas por esta técnica

A clonagem dependente de células é baseada na capacidade de células replicativas, por exemplo, bactérias, de manterem o chamado DNA recombinante no seu interior. DNA recombinante se refere a qualquer molécula de DNA construída artificialmente de dois fragmentos de DNA que normalmente não são encontrados juntos. Um fragmento de DNA será o DNA-alvo a ser amplificado e o outro será o vetor replicativo ou replicon, uma molécula capaz de iniciar a replicação do DNA em uma célula hospedeira apropriada.

A maioria das clonagens dependente de células é feita utilizando-se células bacterianas. Além do cromossomo bacteriano, a bactéria pode conter DNA de fita dupla extracomossômico que pode se replicar. Um exemplo é o plasmídeo bacteriano. Os plasmídeos são moléculas de DNA circulares, de fita dupla, que sofrem replicação intracelular e são passados verticalmente da célula-mãe para cada célula-filha. No entanto, ao contrário do cromossomo bacteriano, os plasmídeos utilizados nestas técnicas são copiados várias vezes durante cada divisão celular. Portanto, os plasmídeos são os replicons ideais para a amplificação de um DNA-alvo, e os métodos envolvendo o uso de plasmídeos são amplamente utilizados em biologia molecular.

O DNA-alvo é introduzido em um replicon com a utilização de enzimas de restrição para clivar o DNA-alvo e o replicon, de forma que o DNA-alvo e o DNA plasmidial linearizados apresentarão extremidades coesivas complementares (Fig. 35.6). A DNA ligase, então, une por ligação covalente o alvo à extremidade do vetor para formar um plasmídeo recombinante circular fechado. Uma vez estando o DNA-alvo incorporado ao vetor plasmidial, a próxima etapa é introduzir o plasmídeo na célula hospedeira para permitir que a replicação ocorra. A membrana celular das bactérias é seletivamente permeável e impede a passagem livre de moléculas grandes, como o DNA, para dentro e para fora da célula. No entanto, a permeabilidade das células pode ser alterada temporariamente por fatores, tais como correntes elétricas (eletroporação) e alta concentração de soluto (estresse osmótico), de forma que a membrana se torna temporariamente permeável e o DNA pode entrar na célula. Estes processos tornam as células competentes, ou seja, elas são capazes de adquirir o DNA exógeno do líquido extracelular, um processo conhecido como transformação. Este processo é em geral ineficiente e assim apenas uma pequena fração das células pode internalizar o DNA plasmidial, e com frequência só um único plasmídeo é introduzido em cada bactéria durante a transformação. Entretanto, este processo de internalização celular do DNA plasmidial constitui uma etapa crítica na clonagem dependente de células. Os DNAs recombinantes individuais são facilmente discriminados um do outro por serem internalizados por células separadas que podem ser isoladas simplesmente pela semeadura em uma superfície de ágar.

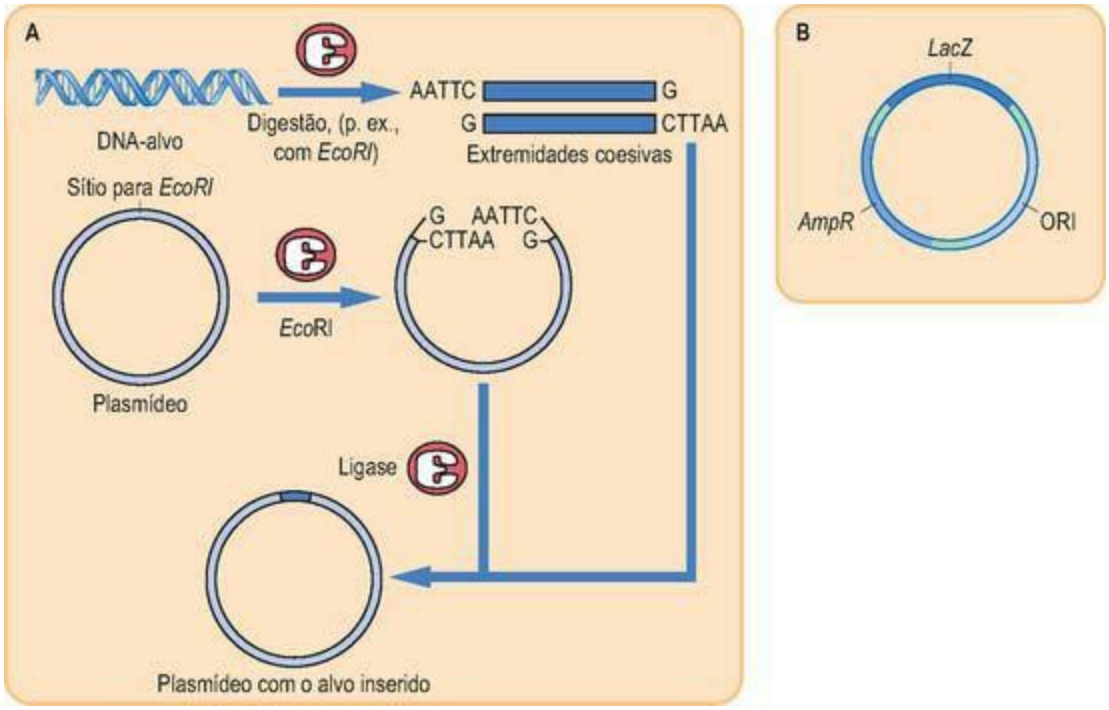


Fig. 35.6 Formação de um plasmídio contendo um gene-alvo para clonagem. (A) O DNA contendo o gene-alvo é digerido por uma enzima de restrição que produzirá "extremidades coesivas", por exemplo, *Eco* RI. O plasmídeo também apresenta um sítio de restrição para *Eco* RI, de forma que quando digerido com *Eco*RI se torna uma fita de DNA linear com "extremidades coesivas" complementares ao alvo. Após a ligação, o alvo e o vetor formam uma molécula recombinante. (B) Estrutura de um plasmídeo típico. O plasmídeo contém um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina (AmpR), e uma porção do gene *LacZ* que codifica o fragmento *N*-terminal da enzimaβ-galactosidase. A linhagem de *E. coli* utilizada neste trabalho apresenta uma enzima β-galactosidase defeituosa que será complementada pelo produto do gene *LacZ* do plasmídeo para formar uma enzima funcional. Dentro do segmento do gene *LacZ* existe uma região de poliligação (*polylinker*) contendo aproximadamente 10 sítios de reconhecimento para enzimas de restrição, que servem como sítios de inserção do DNA-alvo. O plasmídeo também contém ORI, o sítio de origem de replicação do DNA.

Após a transformação, as células se replicam geralmente em uma placa com ágar padrão contendo um antibiótico apropriado para eliminar as células que não incorporaram um plasmídeo. As colônias (clones de células únicas) são, então, "coletadas" e transferidas para tubos para crescerem em meio de cultura líquido, e ocorre uma segunda fase de aumento exponencial do número de células. Assim, de uma única célula e uma única molécula de DNA, em um intervalo de tempo relativamente curto, pode ser gerado um número em um intervalo de tempo relativamente curto, um número muito grande de células contendo plasmídeos recombinantes idênticos (Fig. 35.7). A recuperação do DNA plasmidial é fácil por ele ser um círculo covalentemente intacto, pequeno, e prontamente separado do DNA cromossômico bacteriano por várias técnicas.

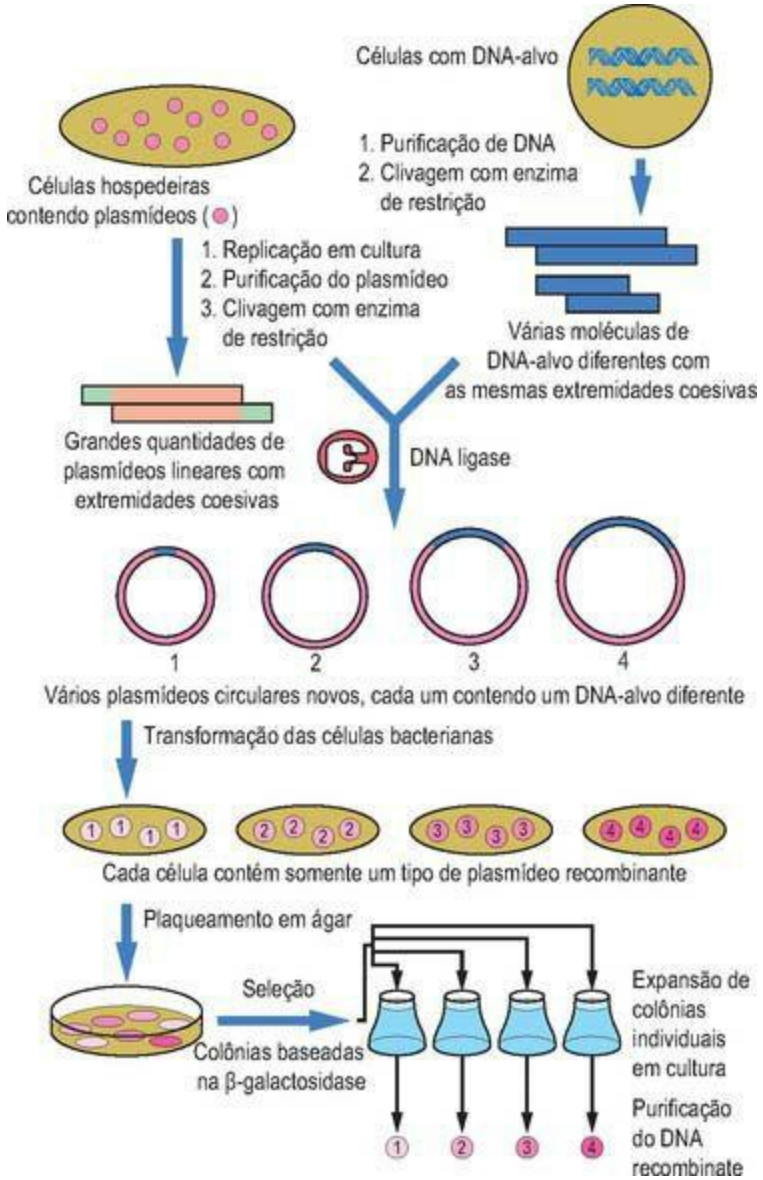


Fig. 35.7 Clonagem de DNA dependente de células. Um exemplo de clonagem de DNA genômico utilizando células bacterianas. Em geral, cada bactéria transformada internalizará apenas uma molécula de plasmídeo. Portanto, as colônias bacterianas individuais conterão muitas cópias idênticas de apenas um DNA recombinante específico.

Plasmídeos bacterianos são construídos por bioengenharia para otimizar seu uso como vetores

Existem vários elementos dentro do DNA circular de uma molécula plasmidial que conferem propriedades específicas ao plasmídeo. Os plasmídeos de ocorrência natural necessitam de várias modificações para serem convertidos em vetores de amplificação de DNA eficientes:

- **um sítio de clonagem de poliligação (*polylinker*)**: é uma sequência pequena de nucleotídeos que contém sítios de reconhecimento únicos para várias enzimas de restrição comuns;

- **um gene de resistência a antibiótico:** as células bacterianas hospedeiras utilizadas para clonagem devem ser sensíveis a um antibiótico, por exemplo, ampicilina ou tetraciclina, de forma que quando são transformadas pelo plasmídeo as células hospedeiras adquirem resistência ao antibiótico. Isto provê uma forma de selecionar as bactérias que contêm o plasmídeo daquelas que não o contêm. Esta etapa de seleção é importante por causa da baixa eficiência na introdução do DNA plasmidial na bactéria.

um sistema de rastreamento recombinante: o plasmídeo comumente apresenta um gene que pode ser expresso e que pode ser usado para mostrar que um DNA exógeno está presente. Este "gene marcador" pode ser desenhado para apresentar uma sequência de poliligação dentro de sua fase de leitura, de modo que se o plasmídeo contém o DNA-alvo inserido a fase de leitura normal é alterada e o gene se torna não funcional. O exemplo mais comum é o gene da β -galactosidase. Uma bactéria contendo este gene pode ser prontamente reconhecida em uma placa de cultura utilizando-se substratos cromogênicos. Se o inserto está presente no plasmídeo, a β -galactosidase não é expressa e as colônias não formam produtos de reação coloridos (Fig. 35.7). Estas colônias são, então, selecionadas para estudos adicionais a fim de se confirmar a presença do DNA-alvo. Esse processo de seleção exclui as bactérias com plasmídeos recircularizados, mas que não incorporaram um inserto de DNA-alvo.

Clonagem do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

O uso da PCR para amplificação do DNA in vitro revolucionou a biologia molecular; este é um método para copiar uma única molécula de DNA molde

A PCR é um método simples e rápido para gerar até 10^9 cópias de uma única molécula de DNA molde em horas. Por causa de sua simplicidade, a PCR tem sido usada em uma grande variedade de pesquisas e aplicações clínicas (Tabela 35.5). Uma das aplicações clínicas da PCR mais utilizada é a identificação de mutações genéticas no DNA amplificado por PCR de indivíduos "sob risco". Uma reação de PCR padrão requer:

- **DNA molde:** DNA que contém a sequência a ser amplificada
- **amplímeros:** pequenos oligonucleotídeos iniciadores que irão hibridizar com as sequências complementares do DNA tanto anterior quanto posteriormente à região da sequência desejada, e atuam como pontos de início para a síntese das novas fitas de DNA recém-amplificadas
- **enzima polimerase:** tipicamente uma polimerase termoestável, estável a temperaturas necessárias para a desnaturação do DNA, que catalisará a formação do DNA durante a reação de amplificação
- **dNTPs:** estes são, é claro, essenciais para a síntese de novas fitas de DNA pela polimerase.

Tabela 35.5 Aplicações da PCR.

Aplicação da PCR	
Aplicação	
Tipagem de marcadores genéticos	polimorfismos de sítios de restrição; repetições de microssatélites
Detecção de mutações pontuais	polimorfismos de sítios de restrição; sistema de amplificação refratária de mutação

Amplificação de moldes de DNA para sequenciamento de DNA	DNA de fita dupla; moldes de fita simples
Clonagem de DNA genômico	PCR de famílias de genes ou genes em diferentes espécies
Outros	movimento ao longo do genoma (*genome walking*), introdução de mutações *in vitro* para testar seus efeitos nos sistemas biológicos

A PCR consiste em uma série de mudanças programadas de temperatura que produzem um ciclo de síntese de DNA dos iniciadores (Fig. 35.8). Em média, uma PCR envolve cerca de 30-35 ciclos de reações, que geram tanto quanto um bilhão de cópias do molde original ($2^{30} = 1 \times 10^9$), de forma que pode ser visualizado após eletroforese em gel de agarose.

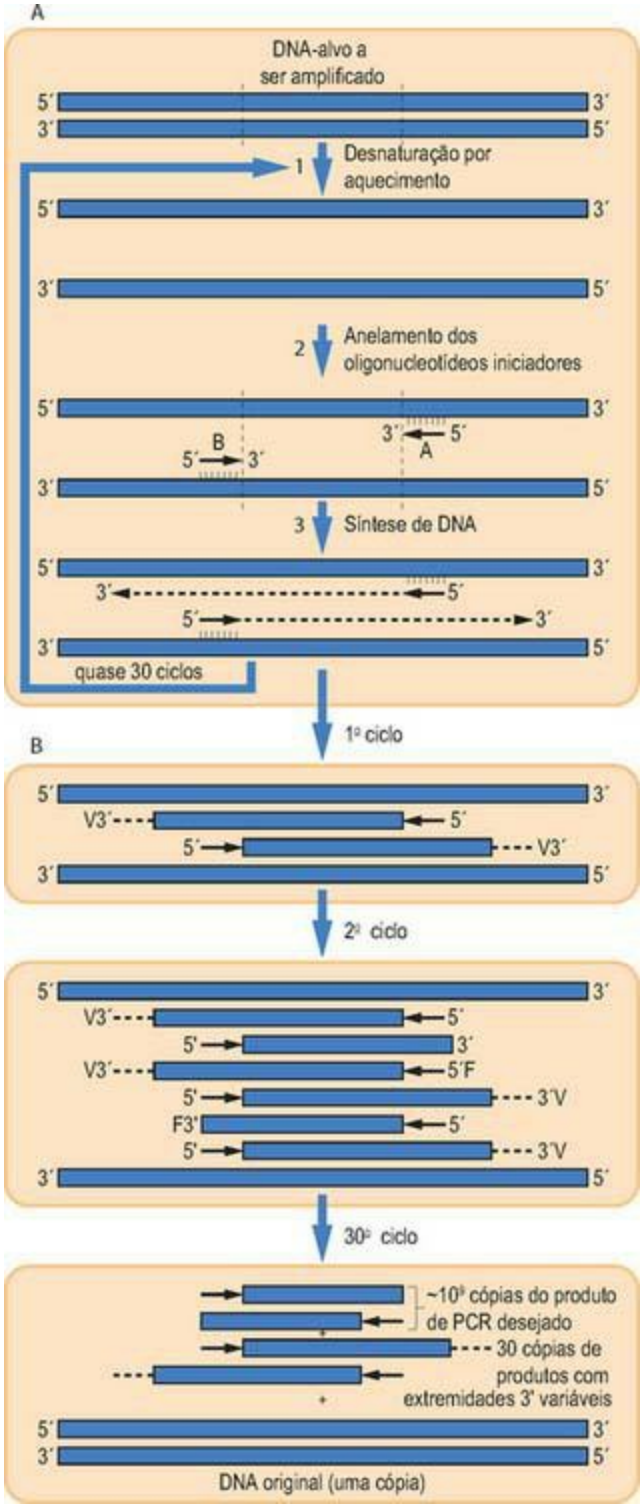


Fig. 35.8 *Amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR)*.(A) Ciclo 1. O DNA-alvo é aquecido a 94°C para garantir a completa desnaturação. A mistura é, então, resfriada para permitir que os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) pareiem com a sequência complementar do DNA-alvo. A especificidade é conferida pelo uso de dois iniciadores que se anelam à s sequências em fitas opostas em extremidades opostas da sequência a ser amplificada. Na presença de dNTPs, a *Taq* DNA polimerase catalisa a extensão, começando da extremidade 3′ dos iniciadores. Duas novas moléculas de DNA duplex: uma gerada por cada um dos iniciadores em seu respectivo molde. (B) Ciclos subsequentes. No segundo ciclo, os produtos do primeiro tornam-se moldes. Estes têm iniciadores em suas extremidades 5‘. Por conseguinte, o DNA sintetizado destes moldes para no final do oligonucleotídeo utilizado no primeiro ciclo. Daí em diante as moléculas que se acumularão a cada ciclo apresentarão ambas as extremidades definidas pelo par de iniciadores utilizados. Estas se acumulam exponencialmente e em pouco tempo ultrapassam a quantidade do DNA molde inicial. Após 30 ciclos, o molde original e um número insignificante de fitas de DNA de extremidades variadas, copiadas diretamente do molde, estão presentes na mistura, mas o número de moléculas amplificadas pelo par de iniciadores é de aproximadamente 10^9 (compare com a Fig. 36.4).

CLONAGEM DEPENDENTE DE CÉLULAS PARA PRODUÇãO DE PROTEÍNAS CLINICAMENTE IMPORTANTES: INSULINA RECOMBINANTE

Uma paciente de 13 anos de idade foi admitida com desidratação, vômito e perda de peso. Seu nível de açúcar sanguíneo era 19,1 mmol/L (344 mg/dl) e ela apresentava cetonúria. Após ter sido diagnosticada como portadora de diabetes melito tipo 1, ela iniciou tratamento com insulina humana recombinante, foi reidratada e recuperou-se prontamente (compare com o quadro da pág. 282).

Comentários. Antes do advento da tecnologia do DNA recombinante, o tratamento com insulina envolvia o uso de insulinas de origem animal, a maioria de origem suína ou bovina, que são quimicamente similares, mas não idênticas à insulina humana. Como consequência dessas diferenças, as insulinas de origem animal frequentemente estimulavam o desenvolvimento de anticorpos, que reduziam a eficácia da insulina e podiam resultar em falhas no tratamento.

A insulina foi a primeira molécula humana clinicamente importante a ser produzida por meio de tecnologia do DNA recombinante. Após a clonagem do gene da insulina humana, a produção em larga escala de insulina humana pura se tornou possível pela inserção do gene clonado em um sistema de amplificação baseado em células. Grandes quantidades de cópias do gene da insulina foram produzidas, os quais foram, então, expressos em bactérias ou leveduras, e a insulina purificada resultante se tornou disponível para uso no tratamento de pacientes diabéticos.

Uma etapa fundamental do processo foi o uso de cDNA como molde para transcrição e tradução do gene desejado. Usando mRNA da insulina como molde, o cDNA da insulina humana foi gerado por transcrição reversa (formação de uma fita de DNA complementar usando mRNA como molde). O produto é uma molécula de DNA que contém toda a região codificadora do gene da insulina sem qualquer íntron. Dessa forma, a insulina humana recombinante quase substituiu totalmente a insulina de origem animal no tratamento de diabetes. Dentre outros peptídeos humanos recombinantes importantes usados clinicamente, destacam-se hormônio de crescimento, eritropoetina e paratormônio.

SISTEMAS DE VETORES PARA CLONAGEM DE FRAGMENTOS GRANDES DE DNA

Um fator essencial das manipulações de DNA recombinante é o tamanho do DNA-alvo. Embora sejam convenientes para se trabalhar, os plasmídeos bacterianos convencionais são limitados com relação ao tamanho do inserto que eles podem aceitar; sendo 1-2 kb o tamanho comum do inserto, com um limite superior de 5-10 kb. Alguns vetores plasmidiais modificados, chamados cosmídios, podem aceitar fragmentos grandes de até 20 kb. Um outro vetor comumente usado capaz de aceitar fragmentos grandes de DNA é o bacteriófago lambda (λ). Esta partícula viral contém um genoma de DNA de fita dupla empacotado dentro de um capsídeo proteico. O fago λ pode infectar células de *E. coli* com alta eficiência e introduz seu DNA na bactéria. A infecção leva à replicação do DNA viral e a síntese de novas partículas virais, que podem, em seguida, lisar a célula hospedeira e infectar as células ao redor para repetir o processo. O DNA viral é, então, reisolado para se obter o DNA recombinante.

Insertos maiores podem ser clonados usando cromossomos modificados de bactérias (cromossomos bacterianos artificiais, BACs), leveduras (cromossomos artificiais de levedura,

YACs) ou seres humanos (cromossomos humanos artificiais, HACs). Tais vetores podem acomodar fragmentos de DNA de até 1-2 Mb. Os BACs têm sido particularmente importantes na inserção conjunta de sequências do genoma humano.

O ciclo da PCR compreende três etapas que são repetidas continuamente por variações de temperatura de uma forma cíclica:

- **desnaturação:** aquecimento da reação a aproximadamente 95°C para garantir que o molde e os iniciadores estejam como fitas simples

- **anelamento:** resfriamento da mistura para permitir a formação de heteroduplex do iniciador com o molde. A temperatura para isto se baseia na T_m do duplex esperado (em geral entre 50°C e 65°C);

- **extensão:** a DNA polimerase alonga a fita de DNA recém-sintetizada, a partir do sítio do iniciador pareado, ao longo da fita molde (tipicamente em torno de 70°C).

O desenvolvimento prático da PCR só se tornou possível com a descoberta de DNA polimerases termoestáveis, por exemplo, as polimerases Taq e Pfu, que podem suportar a temperatura da etapa de desnaturação e ainda manter a atividade enzimática. Estas enzimas foram isoladas de organismos que vivem e se reproduzem em fontes termais e gêiseres.

A capacidade da PCR de amplificar seletivamente um molde único de DNA depende de algum conhecimento prévio das sequências de nucleotídeos das regiões que flanqueiam a sequência-alvo

Se as sequências das regiões que flanqueiam a sequência-alvo são conhecidas, os oligonucleotídeos iniciadores são sintetizados de forma a ser complementares à:

- região da fita senso (superior) anterior (*upstream*) à região-alvo, e

- região da fita antissenso (inferior) posterior (*downstream*) à região-alvo (Fig. 35.8).

É essencial que a sequência de oligonucleotídeos iniciadores seja somente específica ao DNA-alvo a ser amplificado. Normalmente, um tamanho de oligonucleotídeo de 18-20 pb é adequado para a especificidade, desde que o oligonucleotídeo não se encontre em uma região de DNA repetitivo ou não contenha simples repetições como TGTGTGTG. Iniciadores de uma sequência específica são sintetizados a um baixo custo por muitas empresas.

Vantagens e desvantagens da clonagem por PCR

A PCR é uma técnica rápida, simples e robusta, mas é necessário o conhecimento prévio da sequência, somente um DNA-alvo relativamente pequeno pode ser amplificado e a replicação do DNA pode ser imprecisa

A PCR apresenta três principais vantagens em relação à clonagem dependente de células:

- **tempo:** utilizando a PCR, uma única fita molde pode se r amplificada para gerar um produto detectável muito rapidamente. Cada etapa leva alguns poucos minutos ou menos, e 30 ciclos deste processo de PCR podem ser completados em poucas horas. A clonagem dependente de células é mais

onerosa e pode requerer dias ou semanas para produzir uma quantidade semelhante de DNA

- **sensibilidade:** mesmo que haja apenas uma única cópia do DNA molde, este pode ser amplificado em quantidades razoávies pela PCR. Na verdade, protocolos de PCR têm sido desenvolvidos para permitir a amplificação do DNA-alvo de uma única célula. Por isso, a PCR ocupa uma posição de destaque nas aplicações forenses e até mesmo na paleontologia

- **robustez:** a PCR é capaz de amplificar o DNA frequentemente degradado pelo tempo ou por outros fatores, ou que está presente em locais antes inacessíveis, por exemplo, tecidos fixados em formol. Apenas poucas cópias de uma sequência não modificada e relativamente curta necessitam estar intactas para ser amplificadas.

PCR-TRANSCRIPTASE REVERSA

O cDNA (DNA complementar a um mRNA) de um gene pode ser preparado pelo processo de transcrição reversa de sangue total ou tecidos patológicos. A transcrição reversa utiliza uma enzima, transcriptase reversa, para polimerizar uma molécula de DNA complementar à molécula de mRNA, empregando um único iniciador poli T que se liga ao mRNA na sua cauda 3′ poliA. A transcriptase reversa prossegue ao longo do mRNA para produzir uma fita complementar, o cDNA. O cDNA resultante é, então, utilizado como molde na PCR, na qual o cDNA inteiro pode ser amplificado para produzir uma molécula de DNA contendo toda a sequência codificadora de um gene. É claro que, em alguns casos, a expressão gênica é específica de tecido, e não seria esperado encontrar alguns mRNAs presentes no sangue, como, por exemplo, a distrofina do músculo. No entanto, a transcrição ectópica de genes ocorre em baixos níveis nos leucócitos, permitindo a análise de transcritos de genes normalmente não expressos. Isto pode ser útil se o transcrito desejado é derivado de um tecido de difícil acesso ou se o estudo do cDNA pode fornecer informações definitivas quanto à presença de mutações. O cDNA pode, em seguida, ser incorporado a um vetor de clonagem dependente de células para posterior amplificação ou pode ser introduzido em um sistema de expressão celular para gerar o produto gênico *in vitro*. Tais métodos são cada vez mais utilizados no estudo dos aspectos funcionais dos produtos de genes mutantes.

Apesar da aparente atração da PCR, também existem falhas e, dependendo da aplicação do método, pode ser uma forma inaceitável de amplificar DNA. Os inconvenientes da PCR são os seguintes:

- **conhecimento prévio da sequência:** para se realizar a PCR, os iniciadores que flanqueiam a sequência devem ser sintetizados. Para isto acontecer, a sequência do DNA-alvo, ou pelo menos das regiões adjacentes, deve ser conhecida. Como o sequenciamento do genoma humano está quase completo, atualmente isto é menos importante que no passado

- **amplificação de DNA-alvo pequeno:** o tamanho dos fragmentos que podem ser amplificados é limitado. A PCR amplificará de forma precisa sequências de até quase 5 kb. No entanto, produtos maiores têm sido recentemente amplificados por métodos denominados “PCR longas”, permitindo que sequências de até 20 kb ou mais possam ser amplificadas

- **a replicação do DNA pode ser imprecisa:** erros podem ser introduzidos durante a polimerização do DNA pela Taq polimerase, uma vez que essa enzima não apresenta atividade de edição. Recentemente, outras DNA polimerases termoestáveis que possuem atividade de edição e apresentam taxas de erros mais baixas se tornaram disponíveis. Com uma escolha adequada de condições e enzimas é possível se obter uma amplificação precisa de sequências relativamente longas, embora nã o o comprimento total de genes típicos que contêm íntrons, o que pode exceder 50 kb.

Portanto, pode-se dizer que a PCR fornece um meio simples, rápido e muito eficiente para amplificar um DNA parcial ou completamente caracterizado, de tamanho relativamente pequeno e que pode estar presente em pequenas quantidades ou em condições precárias. No entanto, é uma técnica pouco útil quando o objetivo é amplificar o DNA que corresponda ao comprimento de um gene de forma precisa e completamente livre de erros.

MÉTODOS ESPECÍFICOS EMPREGADOS NA ANÁLISE DO ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

Métodos baseados em hibridização

Existem várias formas para se aplicar a hibridização no estudo do DNA, que exploram tanto a estringência da hibridização da sonda com o alvo quanto o emprego de enzimas de restrição para detectar variações nas sequências de nucleotídeos.

Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs)

As enzimas de restrição clivam o DNA em sítios de reconhecimento específicos; se estes sítios estiverem alterados por mutação ou polimorfismo os tamanhos dos fragmentos de DNA em um blot ***serão diferentes***

Uma alteração de um único nucleotídeo no sítio de reconhecimento de uma enzima de restrição torna o sítio completamente resistente à clivagem. Os resultados da análise por Southern blot de um DNA digerido por uma enzima de restrição podem ser diferentes quando a sequência de reconhecimento é eliminada, seja por uma alteração patogênica na sequência do DNA, resultando em uma doença (uma mutação), seja por uma variação de ocorrência natural na sequência do DNA que não causa doença (um polimorfismo). Tais diferenças na sequência do DNA podem levar à criação de novos sítios de restrição ou à abolição de sítios existentes, resultando em fragmentos de DNA de novos tamanhos – os padrões diferentes são conhecidos como polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) (Fig. 35.9). Historicamente, os RFLPs foram usados para identificar mutações causadoras de doenças, para estudar variações no DNA não codificador e para teste de paternidade. Obviamente, muitas alterações no DNA não alteram um sítio de restrição. Os métodos baseados em PCR para identificação de polimorfismos que não necessariamente alteram sítios de restrição – tais como pequenas repetições in tandem (STRs), polimorfismos de base única (SNPs) e repetições in tandem de número variável (VNTRs) – têm substituído amplamente a tecnologia de RFLP.

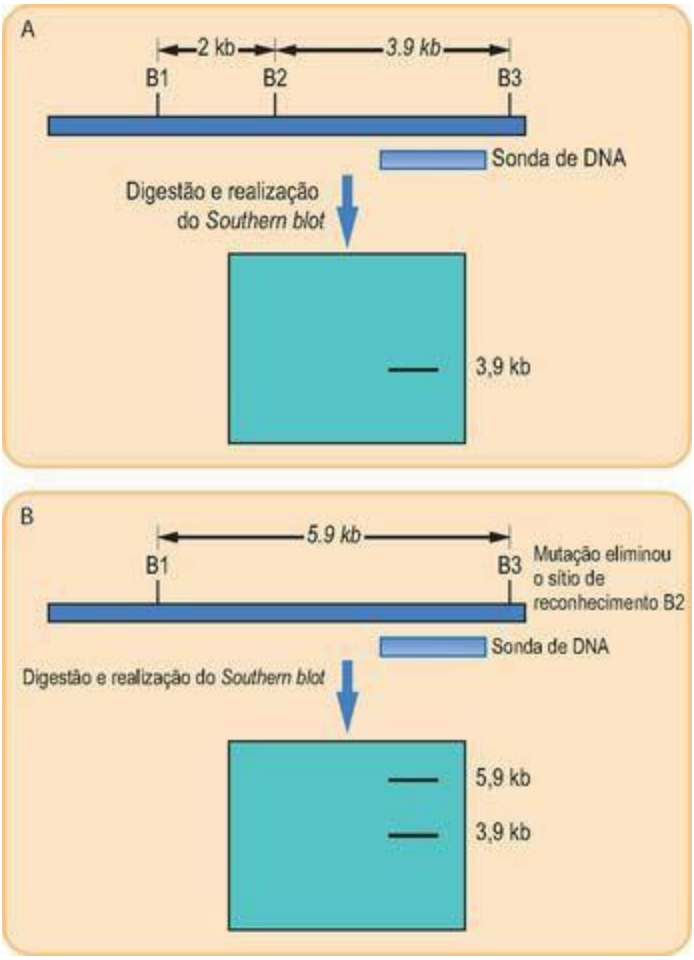


Fig. 35.9 Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP). As variações na sequência de nucleotídeos do DNA, devidas à s variações naturais nos indivíduos ou como resultado de uma mutação no DNA, podem abolir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição. Isto significa que quando o DNA é digerido com a enzima cujo sítio foi eliminado, os tamanhos dos fragmentos resultantes são alterados. As análises por *Southern blot* e a hibridação com sonda podem ser usadas para detectar esta alteração. Os resultados são mostrados para indivíduos homozigotos normais (A) e heterozigotos mutantes (B). B, sítio de restrição para *Bam* HI.

Polimorfismos de base única

A tecnologia de microarranjo é usada para detectar diferenças silenciosas de um único nucleotídeo nas sequências de DNA

Os polimorfismos de base única (SNPs) são variações na sequência de DNA envolvendo alterações em um único nucleotídeo que ocorrem naturalmente na população. Alguns desses são responsáveis por alterações identificadas como RFLPs ou polimorfismo de sítio de restrição, mas as técnicas atuais permitem identificação dessas variações mínimas independentemente de o sítio de restrição estar ou não presente. Os SNPs ocorrem tanto em regiões codificadoras quanto em não codificadoras do genoma, com uma densidade global de 1 por cada 100-300 pb. Os SNPs são, portanto, as variações mais densamente distribuídas de todos os marcadores polimórficos conhecidos. Os SNPs próximos uns dos outros tendem a ser herdados como um grupo. Estas combinações ou agrupamentos de SNPs, chamadas "haplótipos" de SNPs, são detectadas por técnicas de microarranjo para identificar variações gênicas ou genéticas associadas a doenças ou outros traços fenotípicos, tais como resposta a quimioterapia. Se um determinado haplótipo é mais comum em uma população com diabetes, este SNP poderia ser utilizado para limitar o local e

identificar o gene envolvido na doença. Um grande projeto financiado internacionalmente, o Projeto Internacional HapMap, é desenvolvido para caracterizar os mapas de haplótipos de vários grupos étnicos em todo o mundo para ajudar na descoberta de genes associados a doenças humanas. Desde dezembro de 2007, aproximadamente 4,5 milhões dos estimados 10-30 milhões de SNPs no genoma humano foram identificados, caracterizados e catalogados em um banco de dados acessível ao público.

OS RFLPS PODEM SER UTILIZADOS NA DETECÇãO DE MUTAÇÕES PATOLÓGICAS: UM PORTADOR DA MUTAÇãO DA ANEMIA FALCIFORME NO GENE DA GLOBINA

Uma mulher afro-caribenha de 24 anos de idade foi encaminhada para o aconselhamento pré-natal. Seu irmão mais novo tinha anemia falciforme e ela estava grávida. Seu parceiro era portador da mutação que caracteriza a anemia falciforme (traço falciforme) e ela queria saber se o seu bebê poderia desenvolver a doença. Uma vez estando a paciente sob risco de ser uma portadora, ela optou por fazer uma biópsia de vilosidades coriônicas (CVS) para detectar a presença ou ausência da mutação característica da anemia falciforme no seu bebê. A análise do DNA desta paciente revelou que ela era uma portadora e a CVS mostrou que o bebê também era portador e não desenvolveria a doença.

Comentário. Este é um exemplo famoso no qual a mutação que gera o alelo da β-globina correspondente à anemia falciforme altera um sítio de restrição. Uma mutação amplamente examinada é a substituição A > T no códon 6 na sequência do gene da β-globina. Isto resulta em uma mutação glutamina-valina (Glu-Val) na sequência de aminoácidos da β-globina e também elimina um sítio de reconhecimento para*Mst*ll (CCTN(A > T)GG) no gene da β-globina. A digestão do DNA humano normal com *Mst*ll e a análise por *Southern blot* com uma sonda específica para o promotor do gene da β-globina geram uma banda única de 1,2 kb, já que o sítio para *Mst*ll mais próximo está a 1,2 kb acima (*upstream*) da região 5′ do gene. A eliminação do sítio de restrição no códon 6 significa que o tamanho do fragmento observado no DNA digerido com *Mstll* e analisado com a sonda é agora de 1,4 kb, uma vez que o próximo sítio para *Mstll* está localizado 200 bases abaixo (*downstream*) do íntron após o éxon 1. Portanto, pacientes com anemia falciforme apresentarão somente uma banda de 1,4 kb, enquanto os portadores apresentarão duas bandas, uma de 1,4 kb e outra de 1,2 kb, e os indivíduos não acometidos apresentarão uma única banda de 1,2 kb (Fig. 35.11).

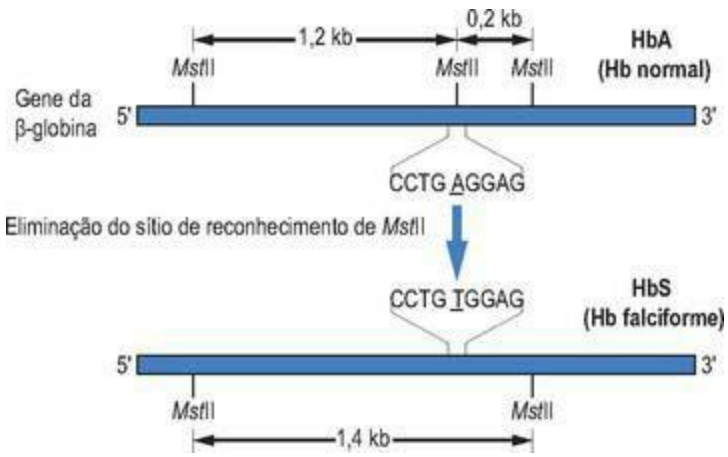


Fig. 35.11 Análise da anemia falciforme por RFPL. Uma substituição A > T no códon 6 do gene da β-globina elimina um sítio de reconhecimento da enzima *Mst*II, o que pode ser utilizado para determinar a presença ou ausência da mutação através do estudo do padrão de RFLP.

Oligonucleotídeos alelo-específicos e hibridização *dot-blot*

Este método utiliza uma sonda pequena para se ligar ao DNA em um blot sob condições de alta estringência

O oposto do método RFLP é o uso de uma sonda pequena (15-30 nucleotídeos) e sua ligação ao DNA em um blot sob condições de alta estringência. A escolha cuidadosa de temperatura e solvente garante que os oligonucleotídeos somente hibridizarão a sequências complementares quando existir um pareamento perfeito entre os nucleotídeos. As mutações resultantes da troca de um único nucleotídeo podem ser detectadas com o uso de oligonucleotídeos que reconheçam tanto o alelo mutante quanto o normal do gene, conhecidos como oligonucleotídeos alelo-específicos (ASOs). Os ASOs podem ser empregados na procura de várias mutações no DNA, particularmente se o DNA molde está imobilizado em uma membrana para análise por dot-blot. O DNA de fita simples é transferido para uma membrana da mesma forma que ocorre no Southern blot. No entanto, em vez de transferir o DNA digerido e fracionado por tamanho, o DNA genômico total humano ou fragmentos gerados por PCR são transferidos para a membrana. Desta forma, os ASOs podem ser hibridizados à membrana sob condições de alta estringência e a autorradiografia permite determinar se o DNA contém um alelo específico. O processo pode, então, ser repetido para outros alelos (Fig. 35.10).

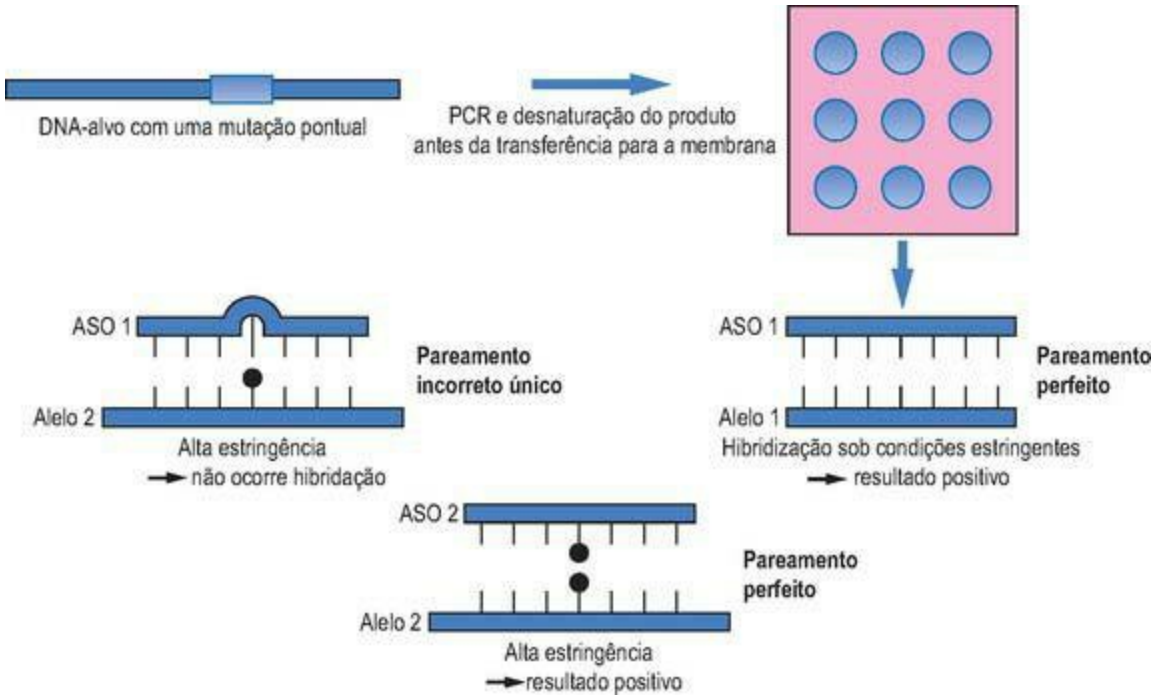


Fig. 35.10 *Dot blots* e oligonucleotídeos alelo-específicos. Utilizando uma técnica semelhante ao *Southern blot*, os produtos de PCR de fita simples são transferidos para uma membrana de náilon e fixados *in situ*, Os oligonucleotídeos alelo-específicos (ASOs) são hibridizados com o DNA-alvo sob condições de alta estringência. Neste caso, os ASOs são utilizados para identificar a substituição de uma única base, sendo que um detecta o tipo selvagem e o outro detecta o alelo mutante.

Detecção de repetições de microssatélites

Esta técnica detecta grupos de repetições de nucleotídeos em sequência (in tandem) ***presentes no genoma de mamíferos***

As repetições de microssatélites in tandem são sequências que compreendem poucos nucleotídeos, tipicamente dois ou três, por exemplo, CA ou CAG, que são repetidos in tandem em vários locais ao longo de todos os genomas de mamíferos, as chamadas repetições de microssatélites. Estes microssatélites são pequenos blocos de DNA que ocorrem em regiões não codificadoras intergênicas ou nos íntrons dos genes. O termo "DNA-satélite" tem sido historicamente aplicado à s regiões de sequências repetitivas, nas quais a composição local de bases pode diferir da composição global do DNA humano. Uma característica importante dessas repetições de microssatélites é que elas são altamente polimórficas, ou seja, o número de repetições *in tandem* em um microssatélite específico pode variar de um indivíduo para outro. Isto significa que as duas cópias de um único microssatélite humano, uma de cada cromossomo, podem apresentar comprimentos diferentes, podendo, portanto, ser distinguidas naquele indivíduo. O número de diferentes alelos do microssatélite variará dependendo de qual microssatélite está sendo estudado, mas pode variar de 2-15 ou mais cópias de repetições por alelo (Fig. 35.12). Como resultado deste alto grau de polimorfismo, as repetições de microssatélites são de grande valia no estudo de ligação genética (*genetic linkage*). Isto porque um alelo de microssatélite específico pode estar fortuitamente localizado próximo a uma mutação patogênica. A comparação do DNA de famílias acometidas pode indicar que um microssatélite em especial serve como um marcador para rastrear a presença ou a herança da mutação em estudo.

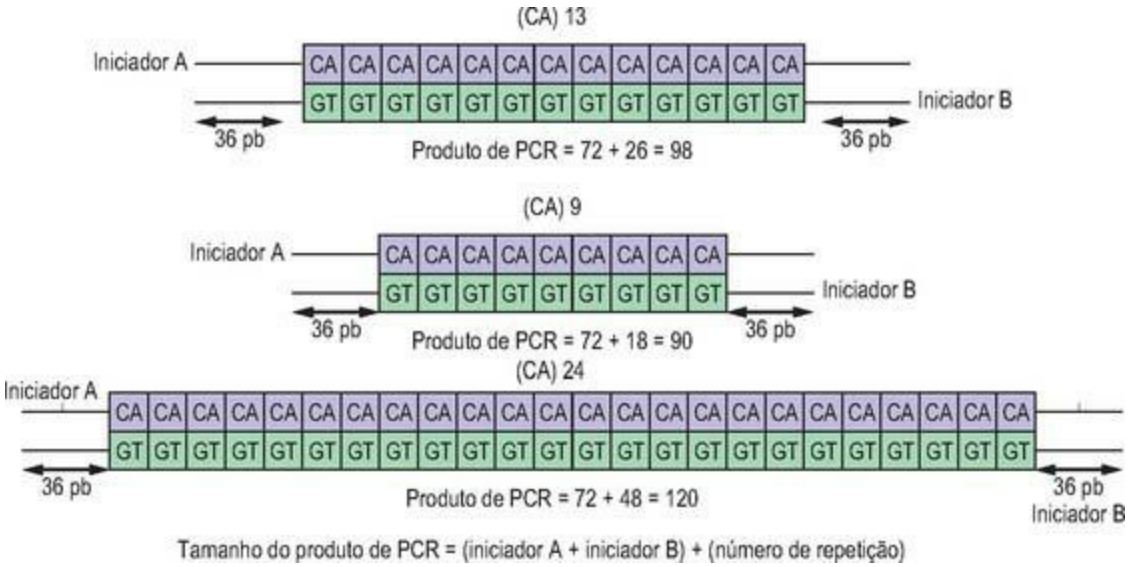


Fig. 35.12 Repetições de microssatélites. Um microssatélite típico contém repetições *in tandem* de um dinucleotídio, por exemplo, CA. O número de repetições pode variar de duas a 20 ou mais. A amplificação do DNA, incluindo a repetição do microssatélite, é feita por PCR, utilizando-se um iniciador marcado radioativamente, e os produtos são, então, separados por tamanho em um gel de poliacrilamida para se obter melhor resolução. Tamanho do produto de PCR = 72 (iniciador A + iniciador B) + 26 (13×2 para

cada dinucleotídeo) = 98. Neste exemplo, três alelos podem ser identificados: $(CA)_{13}$, $(CA)_9$ e $(CA)_{24}$.

Detecção de mutação por PCR alelo-específica

Com o emprego desta técnica, somente o DNA mutado será amplificado

A PCR padrão emprega dois iniciadores para amplificar ambas as fitas do DNA e conta com o fato que cada iniciador amplificará de forma precisa a fita molde. No entanto, a PCR pode ser feita utilizando-se iniciadores alelo-específicos, os quais amplificarão apenas um alelo de um gene-alvo. Por exemplo, se um iniciador contém uma sequência que reconhece somente o gene mutado, ele se hibrididizará apenas ao DNA mutado, amplificando-o. O iniciador alelo-específico apresenta nucleotídeos na extremidade 3′ que pareiam com o gene mutado. Como a DNA polimerase exige a hibridização completa do iniciador e o molde na extremidade 3′ do iniciador, a sonda não hibridizará com o gene normal. Este método pode ser aplicado para detectar mutações específicas em um dado gene, por exemplo, o gene da fibrose cística. Este tipo de PCR é frequentemente chamado sistema de amplificação refratária de mutação (ARMS), porque a amplificação por PCR será refratária, ou seja, não ocorrerá na ausência do alelo mutado.

Detecção de deleções nos genes que causam doenças

Isto é feito utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores que geram produtos de PCR de tamanhos diferentes

Em pacientes com distrofia muscular de Duchenne, muitas das mutações responsáveis pela doença são devidas a deleções de um dos relativamente poucos éxons do gene da distrofina, um dos maiores genes humanos. A amplificação específica desses éxons, utilizando-se iniciadores que geram produtos de PCR de diferentes tamanhos para cada éxon, pode ser utilizada para se checar rapidamente a presença de uma deleção causadora da doença em um indivíduo acometido ou determinar se o feto de uma portadora apresenta a deleção. Este tipo de PCR é realizado como PCR multiplex em uma única reação, utilizando um único molde e 5-10 pares de iniciadores diferentes, cada um gerando um produto de amplificação separado.

AS REPETIÇÕES DE MICROSSATÉLITES SãO MARCADORES IDEAIS PARA O ESTUDO DE HERANÇA

Um menino de 7 anos de idade foi submetido ao teste de paternidade. Sua mãe identificou um homem como pai e requisitou a pensão alimentícia para o filho. Ambas as partes concordaram em fazer o teste de paternidade por meio de *fingerprint* de DNA. O estudo dos testes de DNA revelou que este homem era o pai.

Comentário. Foi reconhecido há mais de 20 anos que padrões de microssatélites de repetições de sequências pequenas *in tandem* poderiam ser usados para *fingerprintings* genéticos e para estabelecer relações entre pais e filhos. Com o desenvolvimento da PCR, tornou-se possível analisar

rapidamente os padrões específicos de repetições de microssatélites. Atualmente, agências governamentais em muitos países têm concordado sobre quais grupos específicos de STRs serão rotineiramente usados na prática forense para ligar evidências criminais a indivíduos específicos e outras situações em que o grau de parentesco precisa ser testado. Por exemplo, nos Estados Unidos, 13 *loci* que envolvem 12 autossomos diferentes e contêm números variáveis de repetições de quatro nucleotídeos foram escolhidos. Esses *loci* não fazem partes de regiões codificadoras do DNA, estando, então, relativamente livres de pressão seletiva. Um lócus adicional não é um microssatélite, mas sim uma região de dimorfismo sexual do gene da amelogenina (AMG). Juntos, esses *loci* formam a base do sistema combinado de índices de DNA (Combined DNA Index System – CODIS), usado pelo serviço federal de investigação (Federal Bureau of Investigation) e pelo banco nacional de dados de DNA dos Estados Unidos (US National DNA Database). O *locus* AMG codifica uma proteína importante do esmalte do dente e está presente sob a forma ativa nos cromossomos X e Y, mas não ocorre recombinação entre estes cromossomos durante a meiose. Portanto, uma deleção de 6 pb no *locus* AMG no cromossomo X nunca está presente no cromossomo Y, e um conjunto de iniciadores para esta região amplifica tamanhos de fragmentos diferentes para cada cromossomo sexual (mulheres normais terão apenas o fragmento pequeno, enquanto homens normais terão tanto o fragmento pequeno quanto o longo). Curiosamente, os conjuntos de iniciadores foram desenvolvidos para ser compatíveis uns com os outros, de forma que todas as 14 amplificações podem ser feitas simultaneamente em um único tubo (conhecida como PCR multiplex). Os iniciadores são marcados com fluorescência, algumas das quais de cores diferentes. Os produtos da reação são tipicamente analisados por eletroforese capilar e cores diferentes de pares de iniciadores permitem que produtos de certos *loci* STR sejam identificados quando os tamanhos de fragmentos de diferentes *loci* possam se sobrepor. É notável que tanta informação possa ser obtida de um único ensaio enzimático.

Os microssatélites também têm sido utilizados para analisar a ligação dos traços de uma doença, por exemplo, diabetes tipo 1, a certas regiões do genoma humano. Pelo estudo da herança de marcadores de microssatélites em famílias ou alelos compartilhados em irmãos acometidos, o grau de codominância de um marcador pode ser determinado estatisticamente. Esta abordagem tem sido utilizada com sucesso na identificação de *loci* gênicos fortemente ligados à herança de diabetes tipos 1 e 2 e na localização dos genes causadores da doença de Huntington, da distrofia miotônica e de outros distúrbios associados a um único gene (Tabela 35.6).

Tabela 35.6 Repetições de trinucleotídeos instáveis. Em todos os casos listados, as repetições de trinucleotídeos estão presentes em indivíduos sem doença clínica. No entanto, o aumento progressivo no número de repetições leva ao início dos sinais clínicos. Uma fase pré-mutante tern sido descrita em alguns distúrbios, como FRAXA, em que são encontradas expansões maiores que o normal, mas com sinais clínicos mínimos ou inexistentes. Estes estados pré-mutantes originam portadores — mulheres que podem subsequente-mente transmitir uma repetição de trinucleotídeos expandida aos seus des-cendentes, o que pode resultar na doença.

Doença	Repetição	Comprimento normal	Comprimento da mutação
Doença de Huntington	(CAG)n	9–35	37–100
Doença de Kennedy	(CAG)n	17–24	40–55
Ataxia espinocerebelar (SCA I)	(CAG)n	19–36	43–81
Atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA)	(CAG)n	7–23	49–75+
Doença de Machado-Joseph (SCA III)	(CAG)n	12–36	69–79+
Sítio A do X frágil (FRAXA)	(CGG)n	6–54	200–1.000+
Sítio E do X frágil (FRAXE)	(CCG)n	6–25	>200
Sítio F do X frágil (FRAXF)	(GCC)n	6–29	>500
Sítio A do 16 frágil (FRA16A)	(CCG)n	16–49	1.000–2.000
Distrofia miotônica	(CTG)n	5–35	50–4.000
Ataxia de Friedreich	(GAA)n	7–22	>200

Outros métodos para detecção de variações no DNA

Polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP)

O SSCP é útil para analisar produtos de PCR de 200 pb ou menos e apresenta sensibilidade moderada

O DNA de fita simples apresenta uma tendência a formar estruturas complexas por dobrar-se sobre si mesmo, da mesma forma que moléculas de tRNA formam estruturas em grampo. A mobilidade de um DNA de fita simples em um gel de eletroforese depende não apenas do comprimento do DNA, mas também da sua conformação, que por sua vez é determinada pela sequência e dobramento do DNA. Portanto, alterações na estrutura do DNA que não modificam o comprimento do DNA-alvo, isto é substituições, em lugar de deleções ou inserções, podem alterar a mobilidade do fragmento em um gel não desnaturante, assim denominado polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP). O SSCP é feito por PCR com um iniciador radioativo. Os produtos da reação são desnaturados, para torná-los fita simples, e diluídos, para prevenir a hibridização intermolecular. O DNA é, então, submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante. Uma amostra controle também é aplicada no gel para permitir a identificação da forma variante e da forma selvagem do alelo, baseada em diferenças na conformação e mobilidade eletroforética.

REPETIÇÕES DE TRINUCLEOTÍDEOS EM GENES ORIGINAM DOENÇAS HUMANAS

Uma mulher de 33 anos de idade obteve recentemente o diagnóstico de distrofia miotônica (MD). A MD é caracterizada por herança autossômica dominante, fraqueza muscular associada a relaxamento muscular deficiente, calvície frontal, distúrbios endócrinos, tais como diabetes, e insuficiência ovariana prematura e formação precoce de catarata. A paciente apresenta problemas musculares e calvície frontal, enquanto seu pai, acometido pela doença, com 60 anos, desenvolveu apenas catarata. Ela está preocupada com o risco de seu filho apresentar a doença, caso ela fique grávida.

Comentário. Enquanto a maioria das repetições de nucleotídeos é não codificadora e clinicamente silenciosa, 11 distúrbios clínicos foram identificados em que as repetições de trinucleotídeos parecem diretamente responsáveis pelo fenótipo da doença (Tabela 35.6), sendo chamadas repetições instáveis. Estas sofrem mudanças no tamanho da repetição durante a divisão meiótica e geralmente sofrem expansão do tamanho da repetição, de forma que a cada meiose sucessiva, ou seja, a cada geração, o número de repetições aumentará gradualmente. Quando as expansões de trinucleotídeos atingem tamanhos críticos, elas começam a interferir na função do gene e, então, resulta na síndrome clínica. No caso de MD, com uma expansão de 80 repetições, o paciente exibirá sinais da doença. Devido à instabilidade da repetição de trinucleotídeos durante a meiose, os descendentes desta paciente podem ter uma expansão maior e também apresentar características da doença. De maneira semelhante, gerações sucessivas podem apresentar sinais de MD mais

precocemente. Este fenômeno de agravamento progressivo do fenótipo clínico com meioses sucessivas é conhecido como antecipação, e é o resultado do aumento gradativo das expansões de trinucleotídeos durante a meiose (Fig. 35.13).

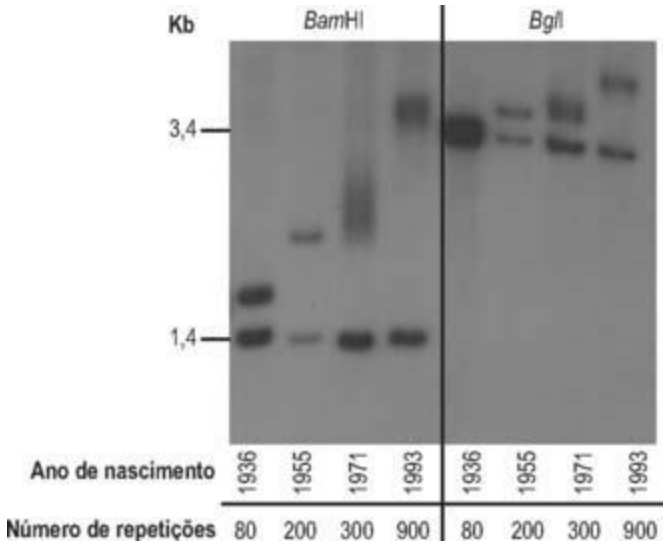


Fig. 35.13 Bases moleculares da antecipação genética. A distrofia miotônica, o tipo de distrofia muscular (MD) mais comum em adultos, exibe sua antecipação dentro de uma família, ou seja, os aspectos clínicos da doença se tornam progressivamente mais graves e a idade de início dos sintomas cada vez menor a cada geração sucessiva. O problema fundamental é a presença de uma expansão instável de trinucleotídeos no gene MD, que se expande progressivamente a cada meiose. Isto resulta na herança de mutações maiores, que originam um quadro clínico mais grave e a tendência para que as características clínicas se manifestem em estágios mais iniciais. O *Southern blot* ilustra o aumento progressivo do tamanho da expansão dos trinucleotídeos em gerações sucessivas de uma família com MD. O tamanho do alelo normal é 1,4 kb para a digestão com *Bam*HI e 3,4 kb para a digestão com *Bgl*I; estas enzimas têm sítios de restrição GGATCC e GCCNNNNNGGC, respectivamente, produzindo fragmentos menores para a digestão com *Bam*HI. Com ambas as enzimas de restrição, é possível se observar uma expansão progressiva do tamanho da repetição dos trinucleotídeos a cada geração, o que é mais evidente no caso dos fragmentos menores de DNA produzidos pela digestão com a *Bam*HI. (Este é um bom exemplo de um RFLP.)

Eletroforese em gel com gradiente de desnaturante (DGGE)

A DGGE utiliza a "desnaturação" do DNA de fita dupla

Na técnica de SSCP, as mudanças na estrutura terciária do DNA de fita simples podem resultar em mobilidades eletroforéticas diferentes. No entanto, o DNA de fita dupla não pode ser analisado por esta técnica. Entretanto, se um DNA de fita dupla é submetido à eletroforese em um gel com um gradiente em quantidades crescentes de desnaturante, tais como ureia, o DNA de fita dupla desnaturará parcialmente, formando regiões de fita simples e sofrendo, assim, uma mudança acentuada na mobilidade. A mudança de um único nucleotídeo entre dois alelos de um gene afetará o ponto de desnaturação (melting point) dos alelos e, portanto, as mobilidades dos fragmentos de PCR amplificados neste tipo de gel desnaturante.

Para realizar a DGGE, a PCR é realizada com iniciadores marcados radioativamente apresentando um grampo de GC em suas extremidades. Esta é uma cauda de resíduos de guanina e citosina adicionada aos iniciadores da PCR, de forma que os produtos da PCR apresentarão extremidades contendo nucleotídeos GC criados artificialmente. Estas extremidades GC, ou grampos, aumentam a sensibilidade por prevenirem a desnaturação completa do DNA de fita dupla. Os

produtos da PCR são submetidos à eletroforese em gel desnaturante e, após a autorradiografia, diferentes alelos do gene suspeito são identificados (Fig. 35.14). A técnica de DGGE é particularmente útil no rastreamento rápido de éxons amplificados individualmente de um gene grande com muitos íntrons.

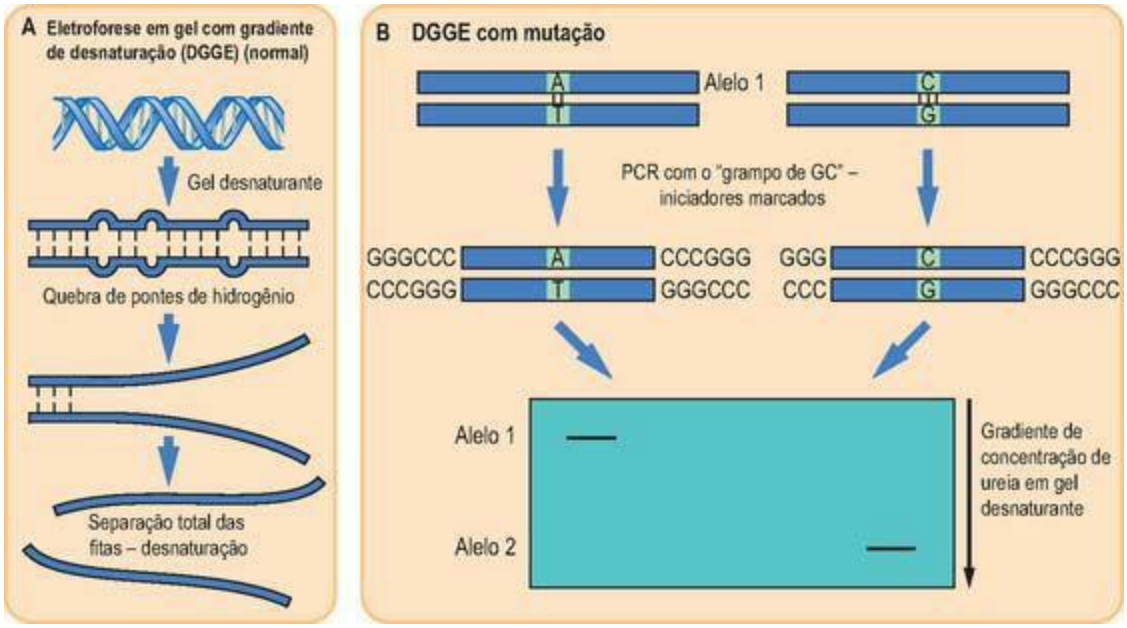


Fig. 35.14 Método DGGE para detectar mutações no DNA. (A) O DNA de fita dupla migra através de um gel contendo um gradiente de concentrações crescentes de agentes desnaturantes, tais como, ureia. O DNA desnatura em uma concentração de desnaturante única para aquele DNA específico, dependendo do seu tamanho e de sua composição de nucleotídeos. Se a sequência de nucleotídeos de um DNA está modificada, por exemplo, por uma mutação, o ponto de desnaturação do DNA será diferente e, portanto, a mobilidade do DNA no gel também estará alterada, permitindo que a alteração seja detectada por autorradiografia. (B) DGGE com mutação. Neste caso, ocorreu uma substituição única A > C. Isto aumenta o número de pontes de hidrogênio entre as duas fitas e altera a mobilidade no gradiente de desnaturante. A diferença na mobilidade através do gel evidencia apenas a diferença entre as sequências de nucleotídíos das duas fitas — não informa onde está e qual é a diferença.

SEQUENCIAMENTO DO ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

Muitas técnicas anteriormente citadas se baseiam no fato de que pelo menos algumas das sequências de nucleotídeos do DNA a ser estudado são conhecidas, particularmente quando os iniciadores da PCR estão envolvidos. As tecnologias atualmente utilizadas no sequenciamento do DNA se tornaram muito sofisticadas, e o sequenciamento automatizado de grandes quantidades de DNA é agora uma técnica-padrão realizada em muitos centros em todo o mundo.

Sequenciamento do DNA por terminação de cadeia (Sanger)

O sequenciamento por terminação de cadeia utiliza uma enzima DNA polimerase, um molde de DNA de fita simples e um iniciador para seqüenciamento

Neste método, o iniciador do sequenciamento é desenhado para ser complementar à região que flanqueia a sequência de interesse e atua como ponto de partida para a extensão da cadeia. A polimerização do DNA requer dNTPs para permitir que a fita seja estendida, mas, além disso, são adicionados didesoxinucleotídeos (ddNTPs) terminadores de cadeia radioativos. Estes são análogos aos dNTPs, mas diferem por não apresentarem o grupo 3′-hidroxila necessário à formação de uma ligação covalente com o grupo 5′-fosfato do dNTP seguinte. Portanto, durante a polimerização do DNA, quando uma cadeia de DNA crescente incorpora um ddNTP, o crescimento da cadeia nucleotídica é interrompido. Um total de quatro reações é realizado paralelamente, cada uma contendo o iniciador, o DNA molde, a polimerase e os dNTPs. No entanto, para cada uma das quatro reações, uma pequena quantidade de um ddNTP radioativo é adicionada (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP), de forma que quatro reações separadas, as reações A, T, G e C, são conduzidas em paralelo. À medida que as cadeias são estendidas, os ddNTPs, que estão presentes em concentrações menores que o dNTP natural, serão incorporados à cadeia no lugar do dNTP correspondente de forma aleatória. Isto significa que em qualquer mistura reacional existirão muitas cadeias de comprimentos variáveis que, quando misturadas, representam a coleção total de fragmentos que poderiam ser terminados com aquela base. As cadeias de DNA de comprimentos diferentes podem ser separadas por eletroforese em um gel de poliacrilamida desnaturante. Estes géis permitem que os fragmentos de DNA divergentes no comprimento em apenas um nucleotídeo sejam separados. Se a reação for feita com um grupo marcado, um dNTP ou o iniciador, a sequência do DNA poderá ser determinada após a eletroforese das quatro reações em paralelo e subsequente autorradiografia (Fig. 35.15). Em geral, este método pode produzir dados de sequências de 300-500 bases posteriores ao iniciador do sequenciamento, mas alguns protocolos permitem a análise de sequências muito mais longas.

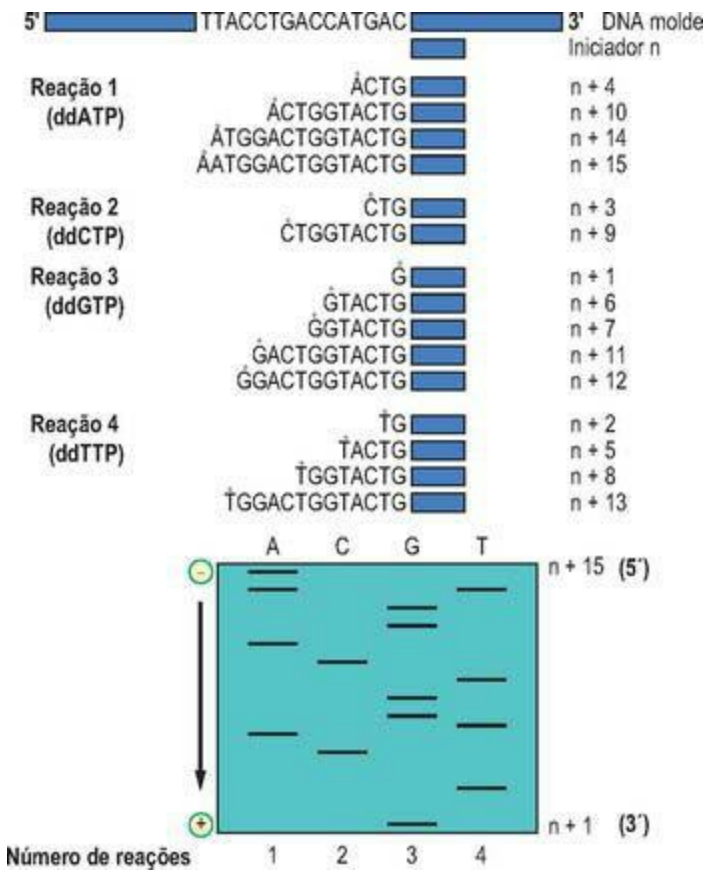


Fig. 35.15 Sequenciamento de DNA utilizando-se didesoxinucleotídeos. Uma única reação envolvendo o DNA molde e o iniciador irá ocorrer até que um ddNTP seja incorporado aleatoriamente à cadeia. Isto para a reação e esta cadeia em particular não pode mais ser estendida. Quatro reações são realizadas em paralelo; cada reação é idêntica com relação ao conteúdo dos quatro dNTPs, exceto pela presença das quantidades mínimas dos ddNTPs marcados radioativamente, que pode ser ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP. Cada reação gera centenas de produtos diferentes com a mesma extremidade 5′, o iniciador do sequenciamento, mas com extremidades 3′ diferentes. O comprimento da extremidade 3′ variará de uma a mais de 300 bases, dependendo de quando o ddNTP for incorporado à cadeia. Quando completas, as quatros reações são submetidas paralelamente à eletroforese em um gel de poliacrilamida e os perfis de bandas paralelos são lidos de baixo para cima, determinando a sequência do DNA (Fig. 36.2).

Atualmente, o sequenciamento de DNA é automatizado usando eletroforese capilar e quatro ddNTPs marcados por fluorescência. Neste caso, um único capilar é usado, porém cada fragmento é terminado e marcado por um único fluoróforo, dependendo do ddNTP incorporado na região 3 terminal. A fluorescência é registrada em um fluorímetro de quatro canais e a sequência de fluoróforos indica a sequência do DNA (Fig. 35.16).

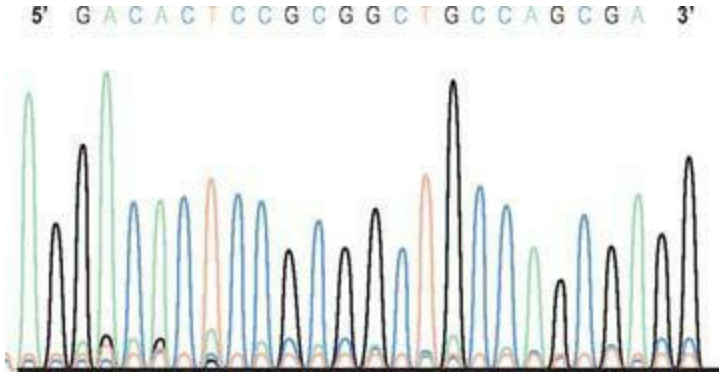


Fig. 35.16 Uma parte da sequência de DNA produzida por eletroforese capilar usando didesoxinucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. À medida que os fragmentos são eluídos do final dos capilares, a fluorescência é registrada em quatro canais diferentes e armazenada, de forma que toda a corrida possa ser analisada em uma tela de computador ou impressa. Na maioria dos casos, as bases são identificadas automaticamente por programa de computador. Dependendo da

especificação do aparelho utilizado, 500 a mais de 1.000 nucleotídeos podem ser sequenciados em uma única corrida.

Pirossequenciamento

Novos métodos de sequenciamento de DNA são baseados em diferentes tecnologias, mas ainda dependem da precisão das DNAs polimerases, que necessitam fundamentalmente dos oligonucleotídeos iniciadores como pontos de partida. Em uma das técnicas mais recentes, minúsculas esferas individuais são preparadas com muitas cópias idênticas de fragmentos relativamente pequenos de DNA amplificados por PCR. As esferas individuais são depositadas em micropoços de uma placa, em seguida permite-se que a DNA polimerase e um único dNTP fluam, um por vez, sobre os poços. Quando um nucleotídeo é adicionado ao final de uma fita em crescimento (o que ocorrerá pelo menos uma vez durante um ciclo de quatro dNTPs), o pirofosfato liberado gera um sinal luminoso pela ativação momentânea de luciferase. A intensidade de luz gerada em cada poço é proporcional ao número de nucleotídeos adicionados, por exemplo, 1, 2 ou 3 unidades de intensidade para sequências A, AA ou AAA, respectivamente. Quando todos os quatro dNTPs tiverem passado pelos ciclos inúmeras vezes, uma sequência pode ser identificada pelo padrão de luz gerada em cada poço. Essa metodologia é mais rápida e muito menos onerosa que as tecnologias já existentes. Aproximadamente 100 milhões de pb de uma sequência de DNA podem ser gerados a partir de um único instrumento “correspondente” em uma corrida de sete horas usando-se a tecnologia de pirossequenciamento.

PCR em tempo real (RT-PCR)

Algumas vezes é necessário quantificar RNA ou DNA em uma amostra clínica. Por exemplo, no caso da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), a determinação da quantidade de RNA viral na corrente sanguínea pode ser um dado valioso para o prognóstico e o tratamento. Nas reações de PCR-padrão, geralmente se examina o DNA produzido após 30 ou mais ciclos quando este já foi amplificado um bilhão de vezes ou mais. Este é um teste qualitativo bastante útil, mas não é recomendável para quantificação. Por exemplo, a quantidade de produtos de PCR aproximadamente dobra a cada ciclo, de forma que pequenas diferenças na eficiência dos ciclos iniciais resultam em grandes diferenças nos ciclos finais. Além disso, todas as reações por fim atingem uma fase de platô devido a muitas razões, incluindo o acúmulo de produtos finais que inibem a reação, e muitas reações terão atingido a fase de platô antes de 30 ciclos.

Para contornar alguns destes problemas, foram desenvolvidas máquinas de PCR em tempo real, as quais medem a quantidade de produto sintetizado nos estágios iniciais da reação, quando ela está ocorrendo em sua taxa máxima. Se houver mais DNA-alvo em uma amostra em particular, menos ciclos serão necessários para produzir uma quantidade definida de produto. Assim, o número de ciclos necessários para produzir uma quantidade definida de produto é uma medida de quantas sequências de DNA estavam presentes no início da PCR.

Na RT-PCR, a formação de produtos é acompanhada pela utilização de corantes que se tornam fluorescentes quando se ligam ao DNA de fita dupla ou pelo uso de alguma forma de sonda de hibridização marcada com um fluoróforo. A quantidade de produto é continuamente medida ao final de cada ciclo da PCR, isto é, pela medida de fluorescência, utilizando uma sonda que intercala no DNA de fita dupla e altera ou intensifica a sua fluorescência após a ligação. Sistemas ópticos sensíveis e eletrônicos poderosos são utilizados, de forma que quantidades muito pequenas de produto podem ser detectadas nos ciclos iniciais e o processo pode ser facilmente automatizado. Este é um meio conveniente de quantificar de forma precisa, sensível e rápida pequenas quantidades de DNA ou RNA (que deve ser primeiro transcrito em cDNA), e a tecnologia está migrando rapidamente dos laboratórios de pesquisa para as aplicações clínicas.

Resumo

Existe uma infinidade de técnicas de DNA disponíveis para a análise de cada aspecto do metabolismo e funcionamento do DNA. No entanto, apesar da complexidade destes métodos, todos dependem dos princípios básicos da hibridização e polimerização por enzimas apropriadas. Sem dúvida alguma, o avanço recente mais importante para o estudo do DNA foi a descoberta e automatização da PCR. Atualmente, a PCR é amplamente empregada em todos os aspectos da pesquisa biomédica e, em particular, no estudo da genética humana. As análises foram totalmente transformadas pela PCR, tanto no diagnóstico laboratorial quanto na pesquisa por novos genes relacionados a doenças. Atualmente existem muitas centenas de doenças genéticas humanas que podem ser diagnosticadas por uma única análise do DNA, baseada em PCR, de uma única amostra de sangue.

A finalização quase completa do Projeto Genoma Humano, em apenas 50 anos desde o descobrimento da estrutura tridimensional do DNA, figura como um dos maiores feitos da humanidade. Com certeza isto simplifica o estudo de genes normais e mutados, uma vez que agora a informação está disponível para desenhar os iniciadores da PCR e predizer os sítios de clivagem para enzimas de restrição para todos os genes. A tecnologia do DNA recombinante substituiu ensaios bioquímicos complexos como a principal tecnologia científica biológica na maioria dos laboratórios. A tecnologia está em contínuo desenvolvimento, mas essencialmente existem vários princípios fundamentais que são modificados para ajustar a aplicação de um método em particular. A compreensão desses princípios é a chave para entender a natureza aparentemente abstrata de algumas dessas técnicas mais recentes.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Uma paciente de 14 anos de idade parecia estar em desenvolvimento sexual normal, exceto pela escassez de pelos corporais. Ela se queixou de nunca ter menstruado. O exame físico revelou um vagina curta e em fundo cego. Como você poderia utilizar a sequência do genoma humano na elaboração de pares de iniciadores para amplificar éxons do receptor androgênico e checar possíveis mutações que poderiam ser responsáveis pela síndrome de insensibilidade a andrógenos?

2. Novos vírus humanos patogênicos surgem com alguma regularidade. Se você participasse de um grande grupo de pesquisa, como poderia aplicar as técnicas de clonagem baseadas em célula para estabelecer a sequência de um novo DNA viral e assim sugerir possíveis proteínas virais que poderiam ser expressas para utilização em uma vacina recombinante? Como você poderia produzir uma vacina contra esse patógeno e vários outros ao mesmo tempo?

3. Uma coleção de clones não identificados derivados do DNA de um organismo é chamada biblioteca genômica. De forma similar, uma coleção de clones não identificados derivados do mRNA de um tecido em particular é chamada biblioteca de cDNA. Por que as bibliotecas de cDNA são mais úteis quando o objetivo é expressar uma proteína específica da hipófise humana em células de levedura, mas uma biblioteca genômica seria necessária se o objetivo fosse caracterizar sítios de ligação de fatores de transcrição na região promotora do mesmo gene?

Leituras sugeridas

Cockerill FR. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127:1112-1120.

Copland JA, Davies PJ, Shipley GL, Wood CG, Luxon BA, Urban RJ. The use of DNA microarrays to assess clinical samples: the transition from bedside to bench to bedside. *Recent Prog Horm Res*. 2003;58:25-53.

Cowell JK, Hawthorn L. The application of microarray technology to the analysis of the cancer genome. *Curr Mol Med*. 2007;7:103-120.

International HapMap Consortium, KA Frazer, DG Ballinger, DR Cox, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007;449:851-861.

Ivnitski D, O'Neil DJ, Gattuso A, Schlicht R, Calidonna M, Fisher R. Nucleic acid approaches for detection and identification of biological warfare and infectious disease agents. *Biotechniques*. 2003;35:862-869.

Renwick P, Ogilvie CM. Preimplantation genetic diagnosis for monogenic diseases: overview and emerging issues. *Expert Rev Mol Diagn*. 2007;7:33-43.

Sebat J. Major changes in our DNA lead to major changes in our thinking. *Nat Genet*. 2007;39(7 Suppl):S3-5. (Short review on CNVs)

Sotirious C, Piccaart MJ. Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care? *Nat Rev Cancer*. 2007;12:271-287.

Sites

National Center for Biotechnology Information – um site introdutório com orientações sobre sequências de genoma (humano e de ratos). www.ncbi.nlm.nih.gov.

Sanger Center for Genome Analysis – uma apresentação alternativa de dados sobre genomas humanos e outros. www.ensembl.org.

US National Institutes of Health: um portal de informações sobre saúde. Look under 'Genetics/Birth defects'. http://health.nih.gov.

Sites institucionais sobre metodologia de RNA recombinante. www.genome.ou.edu/protocol_book/protocol_index.html.

The International HapMap Project. www.hapmap.org/.

Sanger Center: site com informações sobre variação do número de cópias (CNVs) e outras relações com doenças humanas: www.sanger.ac.uk/humgen/cnv/. www.sanger.ac.uk/humgen/cnv/.

Uma descrição da técnica de pirossenquenciamento Uma descrição da técnica de pirossenquenciamento. www.454.com/products-solutions/how-it-works/index.asp.

Animação sobre o sequenciamento Sanger. http://smcg.ccg.unam.mx/enp-unam/03-EstructuraDelGenoma/animaciones/secuencia.swf.

Animação sobre a técnica de microarranjos Animação sobre a técnica de microarranjos. www.bio.davidson.edu/courses/genomics/chip/chip.html.

Animação sobre a PCR. www.dnalc.org/vshockwave/pcrwhole.dcr.

Animação sobre clonagem plasmidial Animação sobre clonagem plasmidial. www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/plasmidcloning.html.

Genômica, Proteômica e Metabolômica

A. Pitt, W. Kolch

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever o que os termos genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica significam.
- Discutir as diferenças entre os métodos –ômica e seus desafios particulares.
- Fornecer diversos exemplos dos métodos usados em genômica.
- Descrever o que são os microarranjos e gerar exemplos de seu emprego.
- Dar exemplos de métodos usados em proteômica.
- Descrever os métodos usados na metabolômica.
- Discutir os biomarcadores.

INTRODUÇÃO

O genoma humano é organizado em 46 cromossomos, consistindo em 22 pares de cromossomos autossômicos, que são compartilhados por ambos os sexos, além dos cromossomos X e Y determinantes do sexo. Um conjunto de cromossomos autossômicos é derivado de cada progenitor. A mãe contribui com um cromossomo X e o pai com outro cromossomo X ou Y. Os cromossomos autossômicos são numerados de acordo com seu tamanho, com o número 1 sendo o maior. Cada cromossomo contém genes intercalados com regiões frequentemente grandes de DNA não codificante de proteína. A maioria dos genes de mamífero consiste em múltiplos éxons, que são as partes do que por fim constituirá o mRNA maduro, e íntrons, que separam os éxons e são removidos do transcrito primário pelo processamento (*splicing*). Surpreendentemente, as estimativas mais novas mostram que as 3 bilhões de bases do genoma humano podem abrigar somente 20.000 a 25.000 genes codificantes de proteína, o que representa somente quatro vezes o número de genes dos fungos e duas vezes mais do que a mosca das frutas *Drosophila melanogaster*, e menos do que muitas plantas. Contudo, as células dos mamíferos usam o processamento alternativo de RNA e promotores gênicos alternativos para produzir quatro a seis mRNA diferentes de um único gene, de forma que o número de mRNA codificando proteínas, ou seja, o transcriptoma, pode atingir um número tão grande quanto 100.000. Essa complexidade aumenta ainda mais no nível proteico por meio de modificações pós-traducionais e proteólises específicas que poderiam gerar entidades proteicas funcionalmente diferentes estimadas em 500.000 a 1.000.000, que compõem o proteoma. Aproximadamente 10% a 15% dessas proteínas atuam no metabolismo, termo que descreve coletivamente os processos usados para gerar energia e os blocos de construção básicos de baixo peso molecular das células, tais como aminoácidos, ácidos graxos e glicídios. Também inclui os processos que convertem substâncias exógenas, tais como drogas ou substâncias químicas ambientais.

Um artigo recente de um primeiro rascunho do metaboloma humano lista aproximadamente 2.500 metabólitos. O verdadeiro tamanho do metaboloma é desconhecido. Ele é aberto, já que crescerá com o número de substâncias ambientais a que um organismo está exposto. A relação entre os diferentes -omas está ilustrada na Figura 36.1.

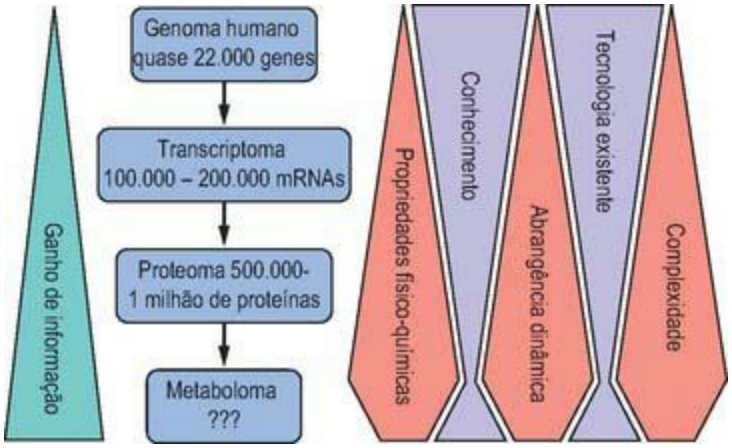


Fig. 36.1 Relação entre as -ômicas. A complexidade, a diversidade das propriedades físico-químicas e a abrangência dinâmica aumentam à medida que passamos dos genes para os transcritos e proteínas, mas podem diminuir de novo no nível dos metabólitos. Isso se apresenta como um enorme desafio tecnológico, mas também representa uma rica fonte de ganho de informação, especialmente se as diferentes disciplinas de -ômica puderem ser integradas com uma visão comum.

Os estudos do genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma propõem diferentes desafios

Inicialmente, as propriedades físico-químicas são bastante uniformes no nível do genoma e do transcriptoma, que consistem inteiramente em DNA e RNA, respectivamente. Por sua vez, o proteoma, e até mais o metaboloma, consistem em moléculas com propriedades físico-químicas amplamente diferentes. Devido à homogeneidade físico-química do genoma e do transcriptoma, os métodos para análise em grande escala e em muitas partes (multiplexed) são mais fáceis de ser estabelecidos e requerem uma gama menor de equipamentos sofisticados. Além disso, o DNA e o RNA podem ser sequenciados e amplificados com facilidade (Cap. 35). Em contraste, as proteínas e os metabólitos não podem ser amplificados e a determinação da sequência ou da estrutura é muito mais difícil. A análise de proteomas e metabolomas gera enormes desafios tecnológicos, principalmente em razão da heterogeneidade físico-química e da ampla abundância. Por exemplo, a concentração de proteínas no soro humano passa de 12 ordens de magnitude, enquanto que, em condições normais, os genes são igualmente abundantes. Segundo, a complexidade aumenta à medida que passamos do genoma para o transcriptoma e daí para o proteoma, enquanto que o nosso conhecimento diminui. Terceiro, há um aumento em sua natureza dinâmica. O genoma é relativamente estático, enquanto que o transcriptoma e o proteoma são mais dinâmicos e podem mudar rapidamente em resposta a estímulos externos e internos. As respostas dinâmicas mais pronunciadas podem se manifestar no metaboloma já que ele reflete diretamente as interações entre o organismo e o ambiente.

GENÔMICA

O genoma gera uma forma de avaliar a probabilidade de uma condição, mas sem dar informações sobre se e quando essa probabilidade se manifestará

A informação sobre "se e quando" pode ser obtida do transcriptoma e do proteoma. O proteoma é indiscutivelmente a fonte mais rica devido à maior diversidade funcional no nível proteico, o que pode gerar um panorama detalhado do estado atual de um organismo. Assim, a informação gerada pelas tecnologias de -ômica é complementar e seu uso para propósito de diagnóstico está cada vez mais disponível no laboratório clínico.

Muitas doenças apresentam um componente genético hereditário

Muitas doenças são provocadas por aberrações genéticas e muitas outras manifestam uma predisposição ou componente genético. O banco de dados OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man – Hereditariedade Mendeliana em Humanos disponível na internet) contém atualmente 4.191 entradas que associam os genes humanos a doenças hereditárias. Dado que o número de genes humanos gira em torno de 22.000, conclui-se que um grande número de doenças possui um componente genético hereditário. Assim, o genoma constitui uma rica fonte de informação não somente sobre nossa fisiologia, mas também sobre a fisiopatologia. Houve atraso nos esforços para encontrar genes para doenças individuais devido ao nosso conhecimento insuficiente do genoma e pela falta de métodos de mapeamento de alta resolução. Essa situação mudou após o fim do sequenciamento do genoma humano em 2003 e devido ao desenvolvimento de novos métodos para o estudo do genoma e do transcriptoma.



O PROJETO GENOMA HUMANO

O Projeto Genoma Humano (HGP) teve início oficialmente em 1990 e culminou com a deposição da sequência completa em bases de dados públicas em 2003. Contudo, análises aprofundadas e a interpretação dos dados terão continuidade ainda por muito mais tempo. O HGP foi único em diversos aspectos. Foi o primeiro projeto global de ciências da vida, sendo coordenado pelo departamento de energia e pelo instituto nacional de saúde dos Estados Unidos. O Wellcome Trust (Reino Unido) se tornou um grande parceiro em 1992 e outras contribuições significativas foram feitas pelo Japão, França, Alemanha, China e outros países. Mais de 2.800 cientistas de 20 instituições ao redor do mundo contribuíram para o artigo que descreve a sequência final em 2004. Também foi conduzido em escala industrial com logística e organização em estilo industrial. De fato, o HGP enfrentou competição do Celera Genomics, uma companhia privada fundada em 1998 e os primeiros esboços das sequências do genoma humano foram publicados em dois artigos paralelos em 2001. O HGP usou uma abordagem "clone a clone", em que o genoma foi primeiro clonado e então esses grandes clones foram divididos em porções menores e sequenciados. O Celera seguiu uma estratégia fundamentalmente diferente, o sequenciamento por fragmentação aleatória do DNA (*shotgun*), em que todo o genoma é fragmentado em pequenos pedaços que podem ser sequenciados diretamente, sendo a sequência completa reunida depois. Essa abordagem é muito mais rápida, mas menos confiável em relação à geração de uma sequência contínua, e muito menos capaz de unir os intervalos na sequência final reunida. O DNA utilizado pelo HGP era uma mistura de numerosos doadores, enquanto que o Celera agrupou o DNA de cinco indivíduos. Os esboços de 2001 do genoma estimavam a existência de 30.000 a 35.000 genes. A sequência refinada do HGP de 2003 confirmou a existência de 19.599 genes codificantes de proteínas e identificou ainda 2.188 genes pressupostos de DNA, um número surpreendentemente baixo. Eles estão contidos em 2,85 bilhões de nucleotídeos cobrindo mais de 99% da eucromatina, ou seja, o DNA que contém os genes. O comprimento médio dos fragmentos contínuos de DNA aumentou de 0,8 para 38,5 milhões de nucleotídeos, o que facilita muito o mapeamento dos genes relacionados a doenças. Há somente 341 intervalos, comparado aos 150.000 presentes na sequência rascunho. Além disso, a sequência atual é

muito acurada, contendo somente um erro por 100.000 pares de base. A sequência final pode ser acessada publicamente por todas as bases principais de dados de nucleotídeos.

Os projetos de sequenciamento do genoma se tornaram possíveis devido ao desenvolvimento de métodos de alto rendimento para o sequenciamento do DNA (Fig. 36.2) e análises avançadas de bioinformática, especialmente para a montagem dos dados sequenciados. Enquanto o genoma humano foi um marco principal, há atualmente quase 3.000 projetos de sequenciamento de genomas em curso em todo o mundo, com mais de 600 já concluídos. Quase 2.000 são projetos do genoma bacteriano, muitos deles com grande relevância para a promoção do entendimento e do tratamento de doenças infecciosas.

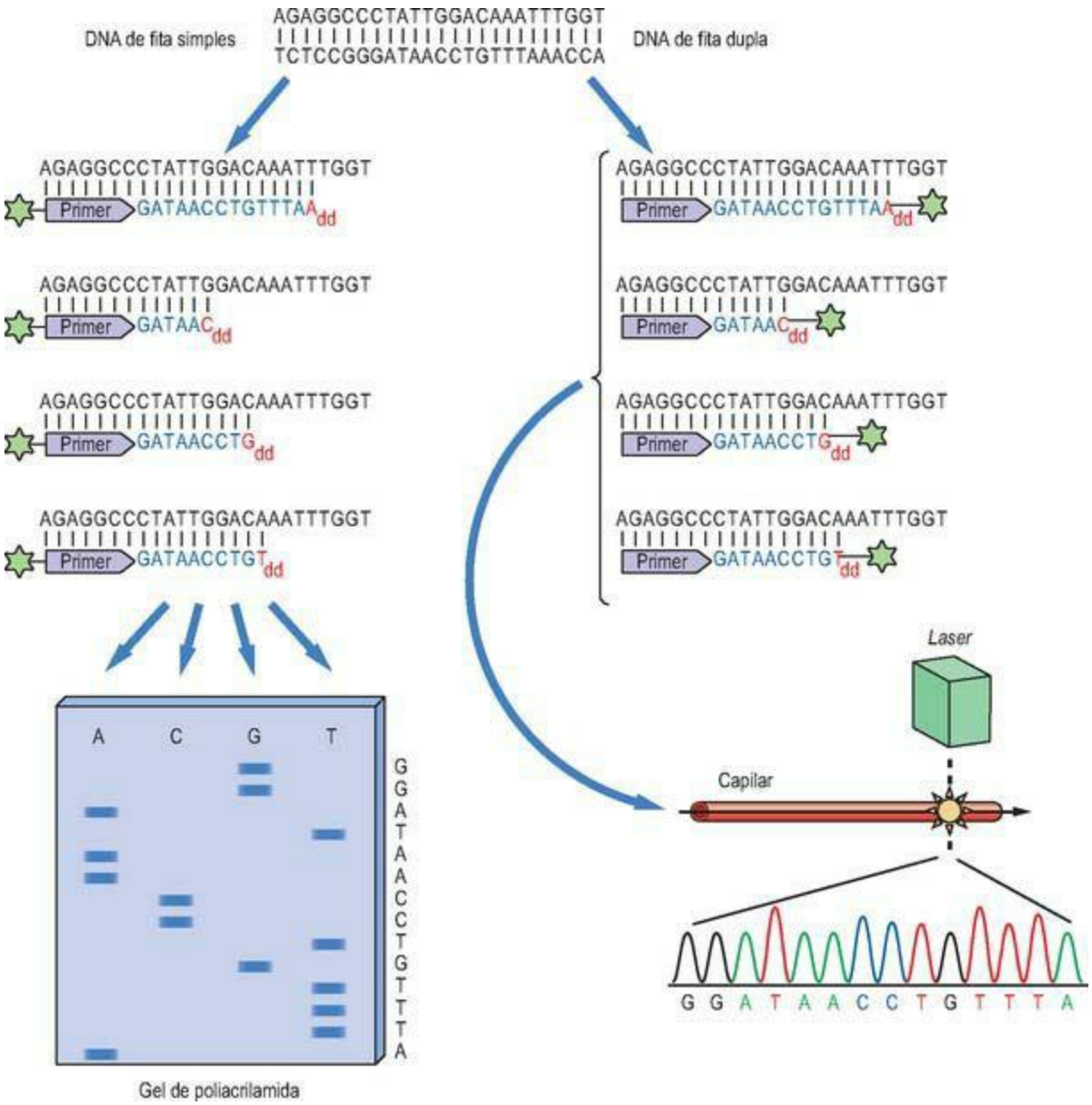


Fig. 36.2 Princípios de análise da sequência do DNA por terminação da cadeia. Há três princípios de sequenciamento do DNA: um baseado na clivagem química em bases específicas (método de Maxam-Gilbert); um baseado na mensuração da extensão da fita complementar quando um dos quatro dNTPs é adicionado (pirossequenciamento); e um baseado na síntese de DNA na presença de pequenas quantidades de nucleotídeos de terminação de cadeia (método de Sanger). O último é o mais utilizado e o método descrito nesta figura. O DNA de fita dupla é aquecido e desnaturado para gerar um DNA de fita simples. Os primers (geralmente hexâmeros de sequência aleatória) são anelados para gerar sítios de iniciação aleatória para síntese do DNA, o que acontece na presença da DNA polimerase, de desoxinucleotídeos (dNTPs) e de pequenas quantidades de didesoxinucleotídeos (ddNTPs). Os ddNTPs não possuem o grupo 3′-hidroxil que é requerido para o alongamento da fita de DNA. Eles finalizam a síntese levando a fragmentos de diferentes

tamanhos, cada um terminando um nucleotídeo específico. Esses fragmentos podem ser separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e a sequência pode ser lida da "escada" de fragmentos no gel. Para visualizar os fragmentos, ou o DNA pode ser marcado pela adição de dNTPs radioativos ou fluorescentes, ou os primers podem ser marcados (como mostrado na figura) com um corante fluorescente. Ao usar ddNTPs marcados com corantes diferentes permite-se que todas as quatro reações sejam misturadas juntas e separadas por eletroforese capilar. A detecção a laser online permite a leitura direta da sequência. Esse "sequenciamento capilar do DNA" gera leituras mais longas do que os géis, permite análise em grande escala e em muitas partes (multiplex) e um alto rendimento. Esse foi o método utilizado para a maior parte do sequenciamento do genoma humano (compare com a Figura 35.15).

Cariotipagem, hibridização genômica comparativa (CGH), análise de microarranjo cromossômico (CMA) e hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

A cariotipagem avalia a arquitetura cromossômica geral

Dentre os primeiros sucessos na exploração da informação do genoma para o diagnóstico das doenças humanas está a descoberta da trissomia do 21 como a causa para síndrome de Down, em 1959, e a descoberta do cromossoma Filadélfia associado a leucemia mielógena crônica (LMC), em 1960. Desde então, a cariotipagem identificou um grande número de aberrações cromossômicas, incluindo amplificações, deleções e translocações, especialmente em tumores. O método se baseia na simples coloração dos cromossomos por Giemsa, ou por outros corantes, que revelam o padrão de bandas característico para cada cromossomo. Assim, o cariótipo avalia as características dos cromossomos visíveis pela microscopia de luz. Apesar de revelar somente informações brutas, como número, forma e alterações grosseiras da arquitetura geral do cromossomo, ainda assim, é um dos pilares da análise genética clínica.

A hibridização genômica comparativa compara dois genomas de interesse

Um refinamento da cariotipagem é a hibridização genômica comparativa (CGH). O princípio da CGH é comparar dois genomas de interesse, geralmente um doente em relação a um genoma controle normal. Os genomas a serem comparados são marcados pela tradução nick com dois corantes fluorescentes diferentes. Para tradução nick, uma DNAse é usada para introduzir quebras ou "nicks" em uma fita de DNA. O DNA então é incubado com uma DNA polimerase I, que estende a terminação 3′ da nick por meio da remoção de nucleotídeos e de sua substituição por novos nucleotídeos. Se essas marcações de carrear tais como radioisótopos ou corantes fluorescentes, a marcação se torna incorporada ao DNA recém-sintetizado. Devido a essa combinação de degradação e nova síntese, a quebra é traduzida por meio da sequência de DNA, daí o nome do método. Os DNAs marcados por fluorescência são então hibridizados a uma extensão de cromossomos normais e avaliados microscopicamente pela análise quantitativa de imagem (Fig. 36.3). Como a fluorescência apresenta uma ampla gama dinâmica (p. ex., a relação entre a intensidade da fluorescência e a concentração da sonda é linear ao longo de uma ampla gama), a CGH pode detectar ganhos regionais ou perda nos cromossomos, com uma precisão muito mais alta e resolução do que a cariotipagem convencional. Perda de 5 a 10 megabases (Mb) são detectáveis por CGH, enquanto que o método é ainda mais sensível em detectar amplificações, que podem ser menores do que 1 Mb. Alterações balanceadas, como inversões ou translocações, escapam à detecção, já que não alteram nem o número de cópias, nem a intensidade da hibridização.

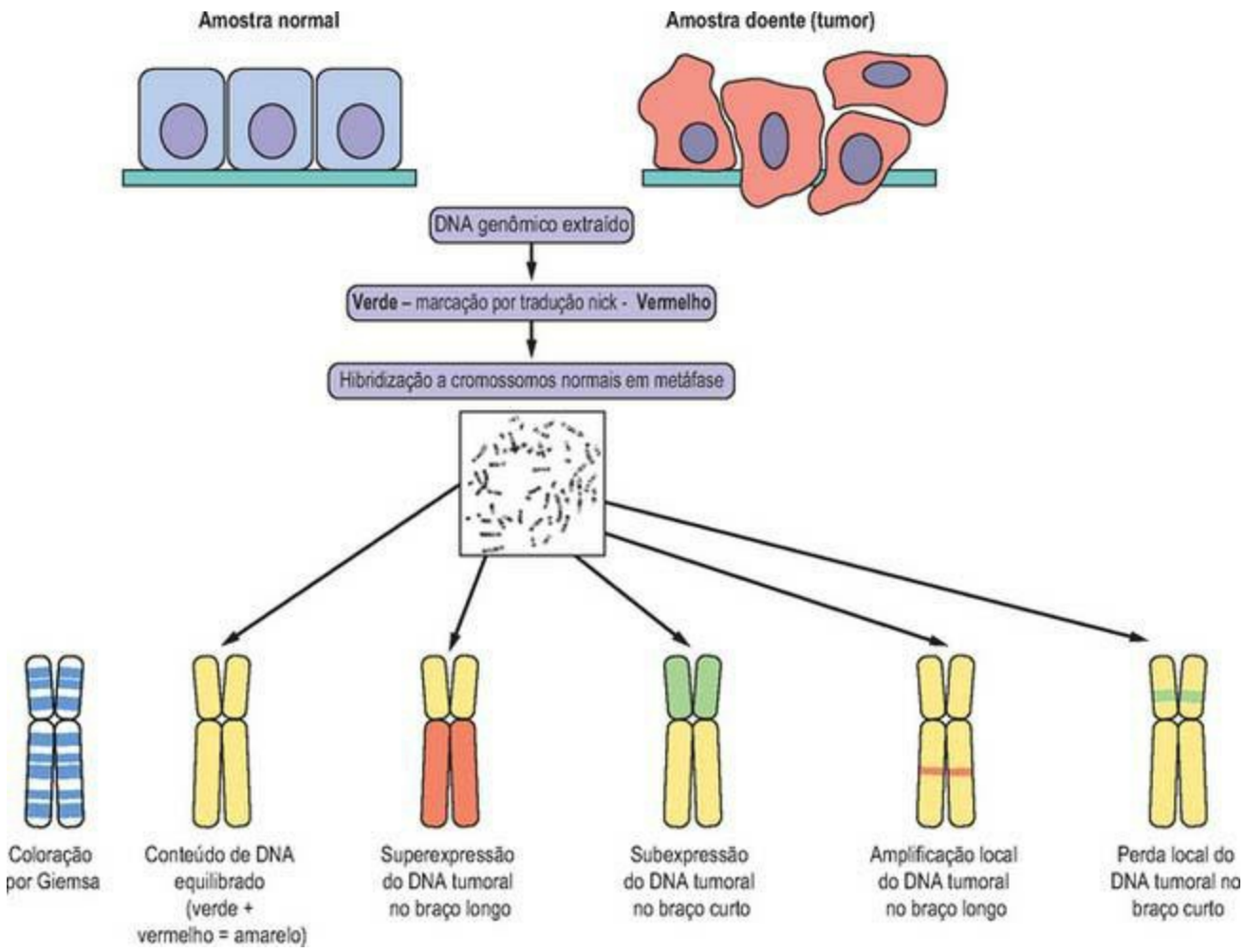


Fig. 36.3 Princípios da hibridização genômica comparativa (CGH). O DNA genômico é isolado de uma amostra normal e uma doente (aqui, um tumor) a serem comparadas. O DNA é marcado por tradução nick com corantes verde ou vermelho, respectivamente e hibridizados a um volume normal de cromossomos. Se o conteúdo de DNA entre as amostras for equilibrado, quantidades iguais do DNA do controle (verde) e do tumor (vermelho) hibridizarão, resultando em uma cor amarela. Amplificações globais ou locais, ou perda de material genético serão reveladas por um desequilíbrio na cor.

Na análise de microarranjo dos cromossomas o DNA marcado é hibridizado a um arranjo de oligonucleotídeos

Outro avanço enorme com relação à resolução pode ser alcançado pela análise cromossômica de microarranjo (CMA; Cap. 35). Nesse método, o DNA marcado é hibridizado a um arranjo de oligonucleotídeos. Tecnologias modernas para a síntese de oligonucleotídeos e para a fabricação de microarranjos podem gerar arranjos que contém vários milhões de oligonucleotídeos em *chips* do tamanho de uma lâmina microscópica. Ao escolher os oligonucleotídeos de maneira que cubram a região de interesse de forma regular e igual, uma resolução muita alta pode ser atingida. A resolução depende, obviamente, do tamanho da região ou genoma, mas está em torno de poucos quilobases (kb) do genoma humano. Assim, alterações no número de cópias entre 5 a 10 kb podem ser detectadas. A CMA está sendo cada vez mais usada na triagem pré-natal para a detecção precoce de defeitos cromossômicos no nível gênico. Uma vantagem é que a sonda para DNA pode ser amplificada pela reação em cadeia de polimerase (PCR; Fig. 36.4), o que permite que se trabalhe com quantidades diminutas de material inicial. Contudo, deve-se manter em mente que as taxas de detecção de

diferentes defeitos gênicos podem variar muito e que essas tecnologias devem ser rigorosamente padronizadas para uso em ambientes clínicos de maneira a minimizar a detecção de erros. Sabidamente, nem o CGH nem a CMA geram informação sobre a ploidia. Contanto que o conteúdo de DNA esteja equilibrado e não seja portador de outras aberrações, um genoma tetraploide seria indistinguível de um genoma diploide.

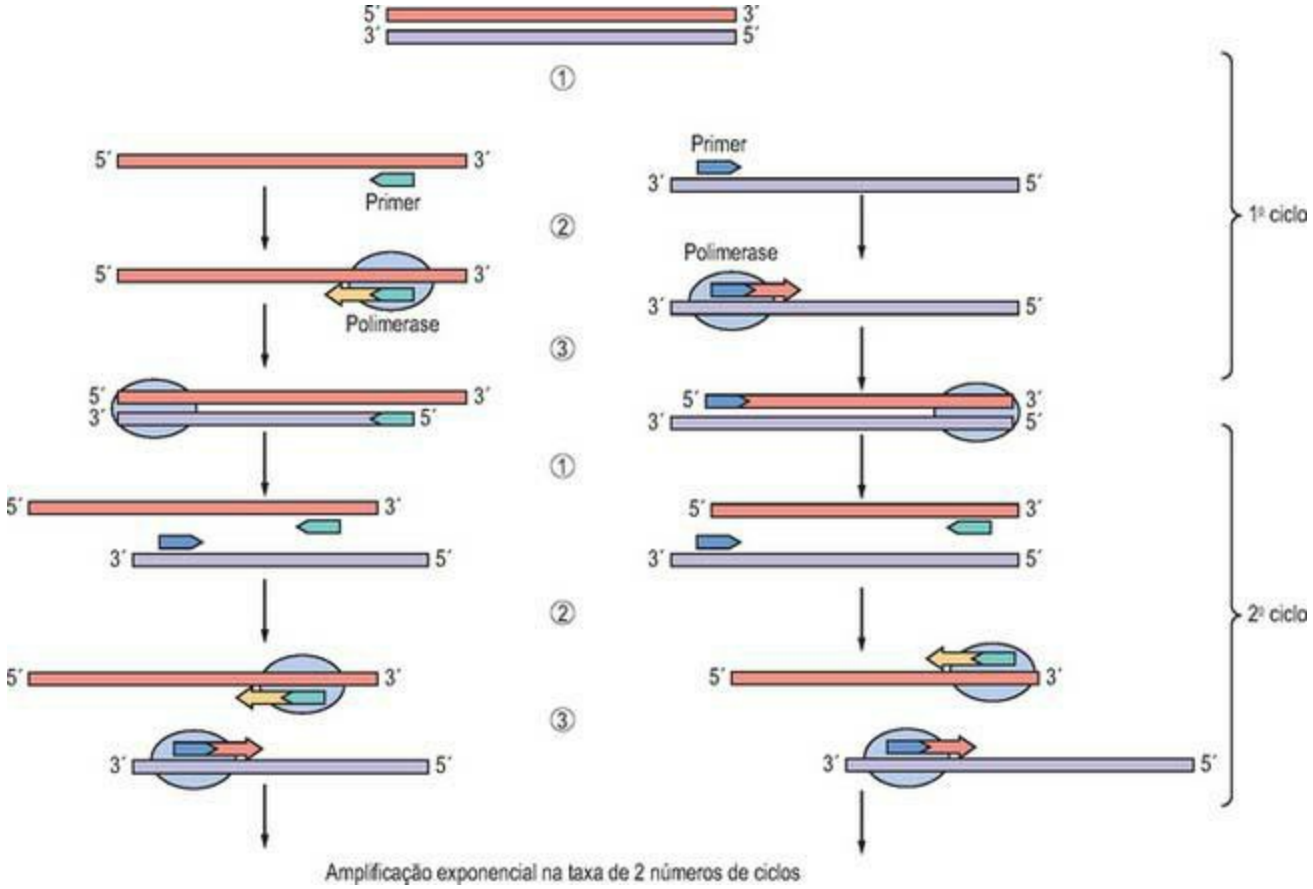


Fig. 36.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR). Esse método é usado para a amplificação do DNA e RNA. O molde de ácido nucleico é aquecido, desnaturado e primers específicos são anelados pela diminuição da temperatura (passo 1). Os primers são estendidos usando a transcriptase reversa, se o molde for um RNA, ou uma DNA polimerase, se o molde for um DNA (passo 2). O resultado é um produto de fita dupla (passo 3), que é aquecido e desnaturado de forma que o ciclo pode recomeçar. Tipicamente, são usados entre 25 e 35 ciclos. A amplificação é exponencial e apesar de, por questões técnicas, a taxa teórica não ser atingida, a PCR permite analisar quantidades diminutas de DNA ou RNA, compatíveis com níveis de uma única célula. O uso de DNA polimerases estáveis ao calor e de alta fidelidade permite a amplificação de fragmentos em até diversos milhares de pares de base de comprimento. Muitas variações da PCR foram desenvolvidas para uma ampla gama de aplicações, tal como a clonagem molecular, a mutagênese dirigida ao sítio, a geração de sondas marcadas para experimentos de hibridização, a quantificação da expressão de RNA, o sequenciamento do DNA, a genotipagem e muitas outras (compare com a Figura 35.8).

A hibridização *in situ* por fluorescência pode ser usada quando se conhece o gene em questão

Se o gene de interesse já for conhecido e clonado, o DNA recombinante pode ser marcado e usado como sonda em extensões de cromossomos. Esse método é denominado hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) e pode detectar amplificações gênicas ou deleções e translocações cromossômicas (Cap. 35). Ao usar marcadores fluorescentes diferentes, diversos genes podem ser corados simultaneamente, mas a informação obtida é confinada à queles genes sob investigação

direta.

As mutações nos genes podem ser estudadas pelo sequenciamento

A disponibilidade de métodos de sequenciamento do DNA baratos, rápidos e robustos tornou possível a caçada em grande escala de mutações gênicas por meio do sequenciamento direto. Há muitos projetos assim, em pequena e grande escala, em andamento em todo o mundo. Exemplos notáveis são os Projetos do Genoma do Câncer, executados pelo Wellcome Trust Sanger Centre, no Reino Unido, e pelo instituto nacional de câncer dos Estados Unidos. O sequenciamento sistemático dos éxons de linhagens celulares de câncer e amostras de cânceres humanos gerou uma riqueza de informações sobre as mutações gênicas que ocorrem no câncer. O objetivo desses projetos é estabelecer um mapa sistemático das mutações no câncer e utilizar esse mapa para a estratificação do risco, para o diagnóstico precoce e para a escolha do melhor tratamento para os pacientes.

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são particularmente úteis na identificação e avaliação do risco de doenças

Os genomas em uma população variam levemente em pequenas alterações, mais frequentemente relacionadas apenas a nucleotídeos simples, denominada polimorfismos de nucleotídeo único (SNP; Cap. 35). O mapeamento sistemático dos SNPs mostrou-se muito útil no estudo da identificação e da hereditariedade genética, sobretudo na identificação e avaliação do risco de doenças genéticas. Os esboços das sequências iniciais do genoma humano revelaram cerca de 2,5 milhões de SNP com um número total estimado em torno de 10 milhões. O projeto HapMap internacional procura catalogar sistematicamente as variações genéticas baseadas em análise em larga escala dos SNPs em 270 humanos de origem africana, chinesa, japonesa e caucasiana.

A forma mais comum de examinar os SNPs é pelo sequenciamento direto ou por métodos baseados em arranjos. Para o primeiro método, o DNA geralmente é amplificado por PCR e então sequenciado. Para o segundo método, os arranjos de oligonucleotídeos contendo todas as permutações possíveis de SNPs são sondados com o DNA genômico, de forma que a hibridização genômica bem-sucedida ocorre apenas quando as sequências de DNA estão exatamente pareadas.

Alterações epigenéticas são traços hereditários que não refletem na sequência do DNA

Apesar de o genoma, como definido por sua sequência de DNA, ser considerado como o material hereditário, também há outros traços hereditários que não são gerados por alterações na sequência do DNA. Esses traços são denominados alterações epigenéticas **(**quadro da pág. 455). Elas geralmente se devem a modificações que afetam a estrutura da cromatina, tal como a acetilação, a metilação e a conexão com a ubiquitina (ubiquitinação). Outra modificação é a metilação do próprio DNA, que ocorre na posição N5 das citosinas, tipicamente no contexto da sequência CpG. A metilação dos grupamentos CpG, denominados ilhas de CpG, nos promotores gênicos pode encerrar a expressão de um gene. Esses padrões de metilação podem ser herdados por um processo pouco compreendido, denominado *imprinting* genômico (Cap. 35). Aberrações nos padrões de metilação dos genes podem provocar doenças e são comuns nos tumores humanos, frequentemente servindo para silenciar a expressão de genes supressores de tumor.

Assim, o mapeamento dos padrões de metilação do promotor se tornou muito importante. Os métodos mais comuns para analisar a metilação do DNA se baseiam no fato de que bissulfitos convertem resíduos de citosina em uracila, mas deixa uma 5-metilcitosina intacta (Fig. 36.5). Essa alteração na sequência do DNA pode ser detectada por diversos métodos, inclusive pelo sequenciamento do DNA tratado em comparação com o não tratado, hibridização diferencial de nucleotídeos que detectam especificamente o DNA mutado ou o DNA não alterado, ou por métodos baseados em arranjos. O segundo, de maneira similar à análise de SNP, também se baseia na hibridização diferencial para encontrar alterações induzidas por bissulfitos no DNA, mas devido a sua habilidade de colocar milhões de sondas de oligonucleotídeos em um arranjo, são capazes de interrogar grandes números de padrões de metilação simultaneamente. As principais limitações são as modificações de bissulfitos que podem ser incompletas, originando falsos positivos, e a grande degradação do DNA geral que ocorre durante as condições adversas da modificação por bissulfito. Além disso, pode se esperar que o epigenoma possua maior variação entre indivíduos. Assim, ele exigirá um esforço maior para sua determinação sistemática, mas também contém mais informação individual, o que pode ser útil para a elaboração de abordagens personalizadas da medicina.

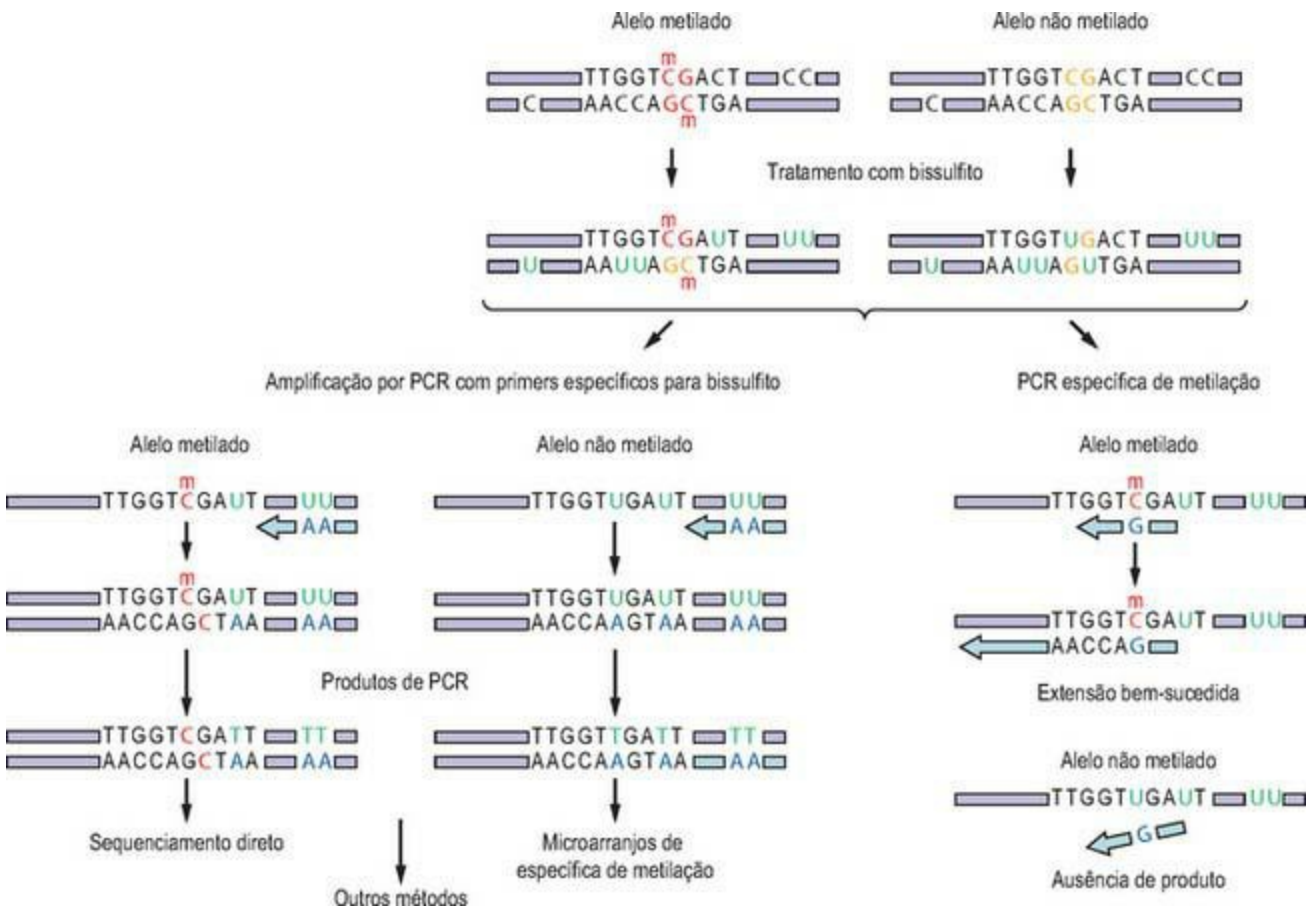


Fig. 36.5 Análise de metilação do DNA. A metilação do DNA ocorre tipicamente na citosina no contexto das "ilhas CpG" (representadas em laranja) que estão enriquecidas nas regiões promotoras dos genes. O bissulfito converte os resíduos de citosina em uracila, mas não afeta os resíduos 5-metilcitosina, o que provoca alterações na sequência de DNA que podem ser detectadas de diversas formas. Muitos métodos usam um passo de amplificação por PCR com primers que irão se hibridizar seletivamente ao DNA modificado (painel à esquerda). Os produtos da PCR apresentam alterações características nas sequências em que os pares de base citosina-guanina não modificados são substituídos por timina-adenina, enquanto a sequência original é mantida quando a citosina foi metilada. Há muitos métodos para analisar esses produtos de PCR. O mais comum são o sequenciamento direto ou a hibridização a microarranjos que contém oligonucleotídeos representando todas as permutações das alterações esperadas. Outro método comum é a PCR específica de metilação (MSP), em que o primer é elaborado de forma que somente possa se hibridizar e se estender se a citosina foi metilada e, portanto, preservada durante o tratamento com bissulfito.

A técnica ChIP-on-chip combina a imunoprecipitação da cromatina com a tecnologia de microarranjo

O mapeamento da ocupação dos sítios de ligação dos fatores de transcrição pode revelar quais prováveis genes são regulados por esses fatores em uma dada situação

A informação contida em um genoma é executada, em última instância pela transcrição de genes específicos. O genoma humano contém muitos milhares de sítios de ligação para qualquer dado fator de transcrição, que são trechos curtos de sequências características de DNA geralmente localizadas na região promotora de um gene. Como os experimentos com arranjos gênicos mostram (ver a seguir), somente poucas centenas desses sítios de ligação realmente parecem ser usados para regular a transcrição gênica em resposta a um estímulo. O desafio é determinar quando e em quais condições um fator de transcrição pode regular determinados genes e quais são eles. Os fatores de transcrição precisam se ligar ao DNA direta ou indiretamente como parte de um complexo multiproteico. Assim, o mapeamento sistemático da ocupação dos sítios de ligação dos fatores de transcrição pode revelar quais genes provavelmente são regulados por esses fatores em uma dada situação. A técnica desenvolvida para isso é denominada ChIP-on-chip ou ChIP-chip (Fig. 36.6). Ela combina a imunoprecipitação da cromatina (ChIP) com a tecnologia de microarranjo (*chip*).

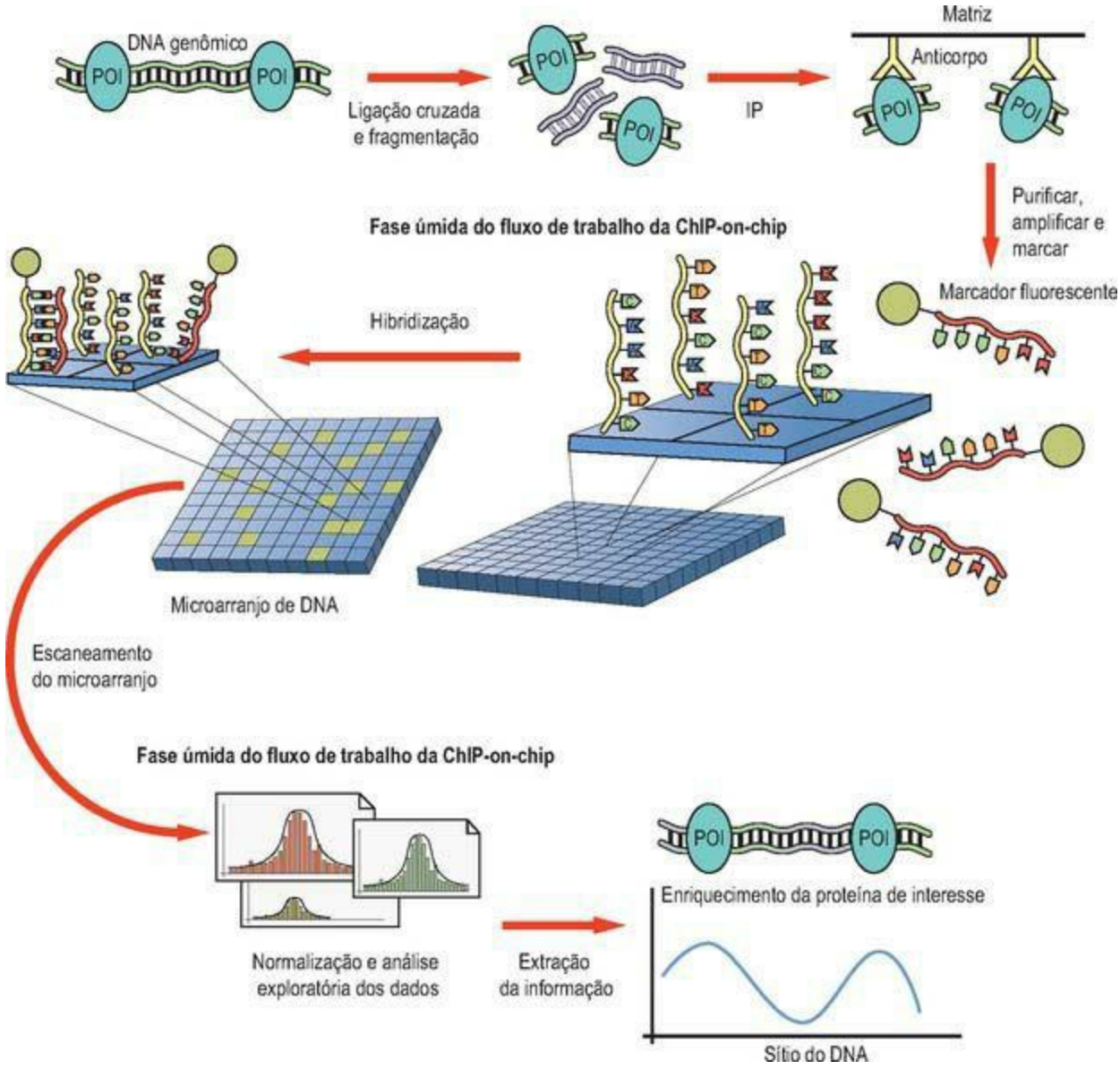


Fig. 36.6 Análise ChIP-on-chip. Ver texto para mais detalhes. *POI, proteína de interesse*. A figura foi modificada de http://en.wikipedia.org/wiki/Image:ChIP-on-chip_wet-lab.png.

A ChIP envolve a ligação cruzada covalente das proteínas com o DNA a que se ligam em células vivas, geralmente pelo tratamento das células com formaldeído. Então o DNA é purificado e fragmentado em pequenos pedaços (0,2 a 1 kb) por sonicação de ultrassom. Esses fragmentos de DNA podem ser isolados por imunoprecipitação da proteína que apresenta ligação cruzada com um anticorpo específico. O DNA então é identificado por PCR por meio de primers específicos que amplificam a região do DNA que se deseja examinar. Esse método é capaz de avaliar somente um sítio de ligação por vez e, portanto, requer uma hipótese que sugira qual(is) sítio(s) deve(m) ser examinado(s). Contudo, a disponibilidade de microarranjos (*chips*) que representam todo ou grande parte do genoma agora permite o uso de fragmentos de DNA isolados como sondas para a detecção de todas as regiões onde a proteína imunoprecipitada se liga de forma sistemática e em grande escala.

A técnica ChIP-on-chip é poderosa e informativa. Um exemplo é a combinação da ChIP-on-chip com a transcriptômica (ver a seguir) em que a ligação de fatores de transcrição aos promotores gênicos pode estar diretamente correlacionada com a transcrição desses genes. Porém, a técnica ChIP-on-chip não se detém a investigar os sítios de ligação para fatores de transcrição. Ela pode ser

usada para estudar qualquer proteína que interaja com o DNA, e assim está sendo cada vez mais usada para estudar proteínas envolvidas na replicação do DNA, no reparo do DNA e na modificação da cromatina. Seu sucesso é dependente sobretudo dos anticorpos que possuam alta afinidade e especificidade ao mesmo tempo, já que as quantidades de DNA que são coimunoprecipitados são muito pequenas, e não há outro passo de separação, somente a especificidade gerada pelo anticorpo.

Transcriptômica

A transcriptômica representa o conteúdo de RNAs que é transcrito de partes do genoma em uma célula, em um conjunto de células ou em um organismo. O processamento diferencial e o uso alternativo do promotor apontam que um gene codifique a quantidade média estimada de quatro a seis variantes do transcrito

Geralmente o termo "transcriptoma" se refere ao conteúdo de mRNAs, ou seja, transcritos que contém sequências codificadoras de proteínas, mas há evidência crescente para a existência de transcrição das regiões não codificantes do genoma que exercem importantes funções estruturais e reguladoras. O transcriptoma é naturalmente mais dinâmico do que o genoma e pode diferir entre diversos tipos celulares e condições distintas. Em razão do processamento diferencial e do uso alternativo do promotor, estima-se que um gene codifique uma média de quatro a seis variantes no nível do transcrito. Portanto, o transcriptoma também é mais complexo do que o genoma. A análise em grande escala do transcriptoma se tornou possível com o uso dos microarranjos e ainda é uma das primeiras e mais bem-sucedidas aplicações da tecnologia de arranjo nas ciências da vida.

(Micro)Arranjos gênicos são ferramentas para o estudo da expressão gênica

Os (micro) arranjos gênicos contêm uma coleção de pontos (*spots*) de DNA organizados em uma lâmina de fase sólida em uma ordem definida, com forma e distâncias estabelecidas e geralmente em grandes densidades, ou seja, até diversos milhões de pontos por arranjo, que possui o tamanho de uma lâmina de microscópio (Fig. 36.7; Cap. 35 e quadro da pág. 464). Esses pontos podem ser cDNAs ou o oligonucleotídeos sintéticos. O DNA complementar (cDNA) é feito do mRNA pela transcriptase reversa, uma enzima que usa o RNA como molde para sintetizar o DNA. Como o DNA é muito mais estável, e mais importante, pode ser clonado em plasmídeos ou em outros vetores para que seja facilmente propagado e amplificado em bactérias, esse passo de conversão permite a captura das sequências transcritas sob a forma de bibliotecas de cDNA. Tais bibliotecas representam um transcriptoma e bibliotecas completas podem ser depositadas como clones individuais em uma lâmina de microarranjo. Esses foram os primeiros arranjos gênicos.

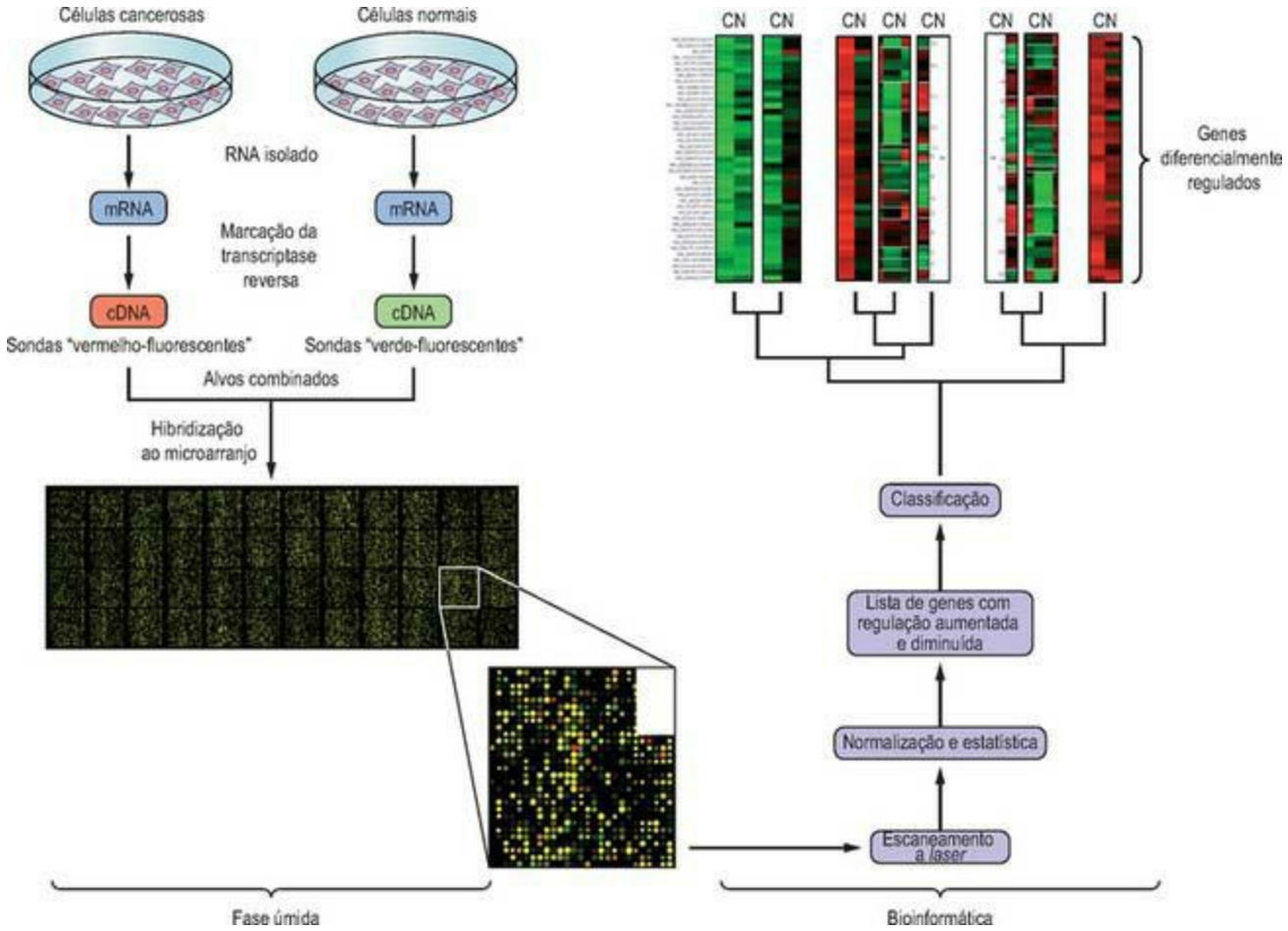


Fig. 36.7 O fluxo de trabalho de um experimento com (micro)arranjo gênico. Um experimento de arranjo em duas cores comparando células normais e cancerosas é mostrado como um exemplo. Veja o texto para mais detalhes. Comumente se mostra os resultados sob a forma de mapas de calor, onde intensidades crescentes de vermelho e verdes indicam genes com regulação aumentada ou diminuída, respectivamente, enquanto que preto significa ausência de alteração. C, células cancerosas; N, células normais. A figura foi modificada de http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_microarray.

Contudo, arranjos de cDNA requerem que cada clone seja totalmente sequenciado, propagado separadamente e que cada cDNA seja individualmente isolado. Assim, eles estão sendo substituídos

por arranjos que usam oligonucleotídeos sintéticos, que podem ser ou pré-fabricados e depositados no *chip*, ou sintetizados diretamente na superfície do *chip*. Geralmente, são usadas diversas sondas de oligonucleotídeos por gene. A versatilidade e a alta qualidade da síntese de oligonucleotídeos tornaram os arranjos com base em oligonucleotídeos ferramentas- padrão tanto no ambiente acadêmico quanto na indústria. Eles são oferecidos por diversos vendedores comerciais como parte de plataformas de análises robustas. As abordagens ainda estão evoluindo e atualmente diferem sobretudo em relação aos comprimentos dos oligonucleotídeos e seu número por gene. Oligonucleotídeos maiores geram melhor especificidade e requerem menos sequências por gene. Oligonucleotídeos menores requerem mais sequências por gene, mas são mais fáceis de fabricar e também aumentam a chance de discriminar as variantes do processamento.

Com grandes avanços na densidade dos pontos do arranjo, novas versões dos arranjos gênicos podem ser elaboradas para deliberadamente mapear o conteúdo dos éxons e das variantes do processamento. São esperados outros progressos na diversificação funcional dos arranjos. Por exemplo, os RNAs não codificantes, tal como os siRNAs e os microRNAs recentemente chamaram a atenção e estão sendo incluídos nos arranjos. Isso resultará em uma resolução muito melhor das alterações transcricionais e, espera-se, em um melhor entendimento dos mecanismos que as provocam.

Os arranjos são hibridizados com cDNA ou cRNA preparado de duas amostras que devem ser comparadas. Eles geralmente são marcados com corantes fluorescentes. Para a detecção em duas cores, as amostras a ser comparadas são marcadas com dois corantes diferentes, misturadas e hibridizadas a um arranjo. Isso gera informação sobre a expressão relativa de genes individuais. Na detecção com apenas uma cor, ambas as amostras são marcadas com o mesmo corante e hibridizadas a duas cópias do mesmo arranjo. Para facilitar a comparação, frequentemente adiciona-se à s amostras um cDNA controle, o que permite a normalização e a comparação entre os dois arranjos. Esse método fornece a quantificação absoluta da expressão gênica. Ele requer mais *chips*, mas facilita a comparação entre diferentes arranjos. Para ambos os métodos, requere-se complexas análises bioinformáticas para a normalização, ou seja, a redução dos erros provocados pela hibridização não homogênea por todo o *chip* e por outras variações da técnica. Além disso, há a questão da classificação das amostras pela identificação dos genes coregulados e a comparação entre experimentos diferentes.

A análise dos experimentos em arranjos gênicos é muito concentrada na bioinformática e também requer análise estatística intensa. Uma convenção comum para o relato dos experimentos de microarranjo foi introduzida e se denomina informação mínima para a anotação dos experimentos de microarranjo (MIAME, minimal information for the annotation of microarray experiments). Contudo, o grande desafio permanece sendo ultrapassar as questões de classificação, deduzindo informação funcional. Há muitas abordagens, mas pouco consenso sobre o melhor método. O objetivo é deduzir informação funcional a respeito de como as alterações na expressão gênica são geradas e como se relacionam aos fenótipos. Há muito mais trabalho por vir.

PROTEÔMICA

A proteômica é o estudo do conteúdo proteico da célula, o equivalente em proteína do transcriptoma e do genoma

A palavra "proteoma" foi cunhada por Marc Wilkins em um conversa em Siena, em 1994, e surgiu impressa pela primeira vez em 1995. Wilkins definiu o proteoma como o conteúdo proteico da célula, o equivalente em proteínas do transcriptoma e do genoma. Desde então o estudo do proteoma, denominado proteômica, se expandiu em uma variedade de temas diferentes compreendendo muitas áreas da ciência de proteínas.

A proteômica é possivelmente a mais complexa de todas as ciências pós-genômica, mas também provavelmente é a mais informativa, já que as proteínas são as entidades funcionais na célula, e quase não há processo biológico que ocorra sem a intervenção de uma proteína. Dentre seus muitos papéis, elas são responsáveis pela organização estrutural de uma célula, uma vez que fazem parte do citoesqueleto, do controle do transporte de membrana (Cap. 8) e da geração de energia. Portanto, o entendimento do proteoma será necessário para entender como a biologia trabalha.

Inicialmente, a proteômica se concentrava no catálogo das proteínas contidas em uma organela, célula, tecido ou organismo, no processo de validação da existência dos genes preditos pelo genoma. Esse cenário rapidamente evolui para a proteômica comparativa, na qual os perfis proteicos de duas ou mais amostras são comparados para identificar diferenças quantitativas que poderiam ser responsáveis pelo fenótipo observado, por exemplo, de células doentes em comparação com células saudáveis, ou à procura de alterações induzidas por tratamentos com drogas. Atualmente, a proteômica também inclui o estudo de modificações pós-traducionais de proteínas individuais, a criação e a dinâmica dos processos proteicos, o mapeamento de redes de interações entre proteínas e a identificação de biomarcadores de doença.

A proteômica propõe diversos desafios

Rapidamente se tornou aparente que a complexidade do proteoma seria o principal obstáculo para atingir o ideal inicial de Wilkins de observar todas as proteínas em uma célula ou organismo ao mesmo tempo. Enquanto que o número de genes em um organismo não é sobrepujante, as modificações pós-traducionais (PTM) das proteínas em sistemas eucarióticos, tal como o processamento alternativo e a potencial adição de mais de 40 grupos químicos de ligação covalente (incluindo os bem-conhecidos exemplos de fosforilação e glicosilação), significa que pode haver 10, ou em casos extremos, 1.000 espécies diferentes de proteínas, todas muito similares, geradas de cada gene, e que os preditos 22.000 genes do genoma humano poderiam originar 500.000 ou mais espécies individuais de proteínas na célula. Além disso, há uma ampla gama de abundância proteica em uma célula, que se estima variar de menos de 10 a 500.000 ou mais moléculas por célula e a função de uma proteína pode depender de sua abundância, de modificações pós-traducionais, da localização na célula e da associação de outras proteínas – e tudo isso pode mudar em frações de segundo! Não há um equivalente proteico da PCR que permitiria a amplificação das sequências de ácido nucleico, de forma que estamos limitados à quantidade de proteína que pode ser isolada de uma amostra. Se a amostra for pequena, como uma biópsia por agulha, um tipo celular raro, um complexo de sinalização isolado, então métodos ultrassensíveis são necessários para detectar e analisar as proteínas.

MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS

Durante o processo de transcrição, de tradução e no funcionamento da célula, as proteínas podem sofrer uma gama de modificações. Durantes a transcrição, os íntrons são retirados do gene e um processamento diferente do gene pode resultar em uma variedade de mRNA diferentes sendo produzidos e, portanto, uma quantidade de proteínas que diferem marcantemente em sua sequência podem surgir do mesmo gene. Após a tradução do mRNA em proteína, a proteína pode ser "decorada" com uma gama desconcertante de grupos químicos adicionais ligados covalentemente a ela, a maioria dos quais é necessária para a atividade da proteína. Alguns exemplos são dados a seguir:

- A adição de ácidos graxos aos resíduos de cisteína, que ancoram a proteína na membrana.
- Glicosilação: a adição de oligossacarídeos complexos a um resíduo de asparagina ou serina, que é comum em proteínas de membrana, que possuem um componente extracelular ou são secretadas. Muitas proteínas envolvidas nos eventos de reconhecimento célula-célula são glicosiladas, assim como os anticorpos.
- Fosforilação: a adição de um grupo fosfato à serina, treonina, tirosina ou resíduos de histidina. Essa é uma modificação que pode ser adicionada ou removida, permitindo que um sistema responda muito rapidamente a uma alteração do ambiente. É fundamental para os eventos de sinalização celular. Foi estimado que um terço de todas as proteínas eucarióticas pode sofrer fosforilação reversível.
- Ubiquitinação: a adição de uma cadeia de poliubiquitina a uma proteína que seja alvo para a destruição por um proteassomo. A ubiquitina, por si mesma, é uma proteína pequena.
- A formação de pontes de dissulfeto entre resíduos de cisteína da cadeia principal do polipeptídeo que estão bem-unidos no espaço uma vez que a proteína esteja dobrada. Elas possuem diversas funções, incluindo fornecer estabilidade estrutural adicional, especialmente para proteínas exportadas, e perceber o equilíbrio redox na célula.
- A acetilação de resíduos, mais o N-terminal da proteína ou da lisina. A acetilação das lisinas ou das histonas possui um papel

importante no processo de transcrição gênica e as drogas que têm como alvo as proteínas que acetilam ou desacetilam as histonas são terapias em potencial para o câncer.

Clivagem proteica: a maioria das proteínas possui uma metionina N-terminal que resulta da remoção do códon de iniciação ATG durante a tradução gênica. Em algumas proteínas, ocorre a clivagem da cadeia polipeptídica, tal como na ativação dos zimogênios na cascata da coagulação, ou então partes significativas da cadeia polipeptídica inicial são removidas completamente, por exemplo, na conversão da pró-insulina em insulina.

Está claro que a proteômica é uma empreitada desafiante. Foi somente após a introdução de novos métodos de espectrometria de massas em meados dos anos 1990 que esforços puderam ser feitos no intuito de analisar o proteoma, e novos métodos de alto rendimento e de alto conteúdo de dados estão sendo continuamente desenvolvidos.

A proteômica na medicina

Apesar dos desafios, a proteômica tem sido uma ferramenta vital no entendimento dos processos biológicos fundamentais e permanecerá importante como parte do equipamento da pesquisa científica. A abordagem proteômica apresenta a vantagem de ser possível descobrir novas informações sobre um problema biológico sem ter que possuir, previamente, um entendimento claro do que pode estar alterado. Frequentemente, há mais dados gerados por um bom experimento de proteômica do que é razoável ou possível entender. A proteômica foi aplicada de forma bem-sucedida ao estudo de alterações bioquímicas básicas em muitos tipos diferentes de amostras biológicas: células, tecidos, plasma, urina, CSF e até mesmo no fluido intersticial coletado por microdiálise. Em células isoladas de cultura celular, é possível fazer perguntas biológicas fundamentais complexas. Um campo amplamente estudado é tentar decifrar as cascatas de sinalização mitogênicas, que envolvem associação especificas de proteínas e complexos multiproteicos, além do entendimento de como elas podem seguir rotas erradas no câncer. Há a possibilidade de obter informações dos fluidos biológicos sobre o estado geral de um organismo porque, por exemplo, o sangue está em contato com todas as partes do corpo. As doenças em localizações específicas podem por fim se mostrar sob a forma de alterações no conteúdo proteico do sangue, já que ocorre o extravasamento do tecido lesado. Atualmente, essa área com frequência é descrita como descoberta de biomarcadores. Os tecidos são um desafio maior. A heterogeneidade de muitos tecidos torna difícil comparar biópsias teciduais que podem conter quantidades diferentes de tecido conjuntivo, vasculatura etc. O aumento da sensibilidade está sobrepondo esse problema, permitido que pequenas quantidades de material obtido por captura por microdissecção a laser ou por citometria de fluxo sejam usadas para análise. Em última instância, seria muito valioso analisar células individualmente. As abordagens atuais fazem a média das alterações na amostra analisada: assim, uma alteração relatada de 50% no nível de uma proteína teria a chance de 50% de estar em todas as células ou a chance de 100% de estar em 50% das células da amostra.

Principais métodos usados na proteômica

A proteômica se baseia fundamentalmente na separação de uma mistura complexa de proteínas ou peptídeos, na quantificação das abundâncias proteicas e na identificação das proteínas.

As estratégias usadas para reduzir o número de proteínas a serem analisadas enquanto ainda retêm a informação essencial também são importantes, tal como o isolamento de organelas individuais ou a imunoprecipitação de complexos proteicos. Uma gama de propriedades físico-químicas das proteínas (tamanho, carga, hidrofobicidade etc.) aumenta a complexidade da análise, mas também oferecem os meios para a separação das misturas complexas. A separação pode ser atingida de muitas formas, mas o eixo principal para a proteômica é a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), principalmente a PAGE bidimensional (2DE, 2D-PAGE) e a cromatografia líquida, enquanto que o principal método para a identificação das proteínas é a espectrometria de massas. As estratégias de quantificação dependem das técnicas usadas, mas se baseiam em sua maior parte em corar os géis com marcadores proteicos quantitativos ou na adição de marcadores fluorescentes ou isotópicos à s proteínas.

Eletroforese em gel bidimensional (2DE)

Ela tem sido usada nos estudo das proteínas por muitos anos, mas ainda é umas das técnicas chaves para a proteômica.

Na 2DE, as proteínas são separadas na primeira dimensão segundo as diferenças em seus pontos isoelétricos (pI), que correspondem ao pH em que a proteína não apresenta carga elétrica. Mais comumente, isso é feito em fitas de gel de poliacrilamida montadas em um suporte plástico, com um gradiente de pH imobilizado nelas. As proteínas são carregadas na fita e então se aplica uma voltagem. As proteínas nos pontos do gradiente de pH onde o pH é acima de seu pI terão uma carga elétrica negativa e se moverão em direção ao catodo (o eletrodo positivo) e aquelas abaixo possuirão uma carga positiva e se moverão em direção ao anodo (o eletrodo negativo). As proteínas continuarão a se mover até que atinjam o ponto da fita onde o pH é tal que as cargas positivas e negativas das moléculas das proteínas estejam equilibradas e elas não apresentem carga elétrica, onde elas pararão. A proteína, com o tempo, se tornará então concentrada nesse ponto da fita de gel. A fita é então colocada no topo de um gel maior e as proteínas são separadas na segunda dimensão de acordo com seu tamanho, usando o gel de poliacrilamida como uma peneira que permite que as moléculas menores passem por ele mais facilmente do que as grandes. Para que as proteínas sejam visualizadas no gel, elas podem ser coradas com um corante específico para proteínas, comumente o azul de Coomassie, ou um corante fluorescente, como o Sypro Ruby. As proteínas se apresentam como manchas discretas no gel, sendo a intensidade da coloração relacionada diretamente à quantidade de proteína presente. Geralmente é possível ver de 1.500 a 2.500 manchas em um único gel. Comparações de géis de diferentes amostras que correram sob condições praticamente idênticas podem então ser usadas para identificar as diferenças no nível proteico (Fig. 36.8). Certo número de replicatas é necessário para diferenciar as variações biológicas gerais das amostras de diferenças reais que são resultado das diferentes situações.

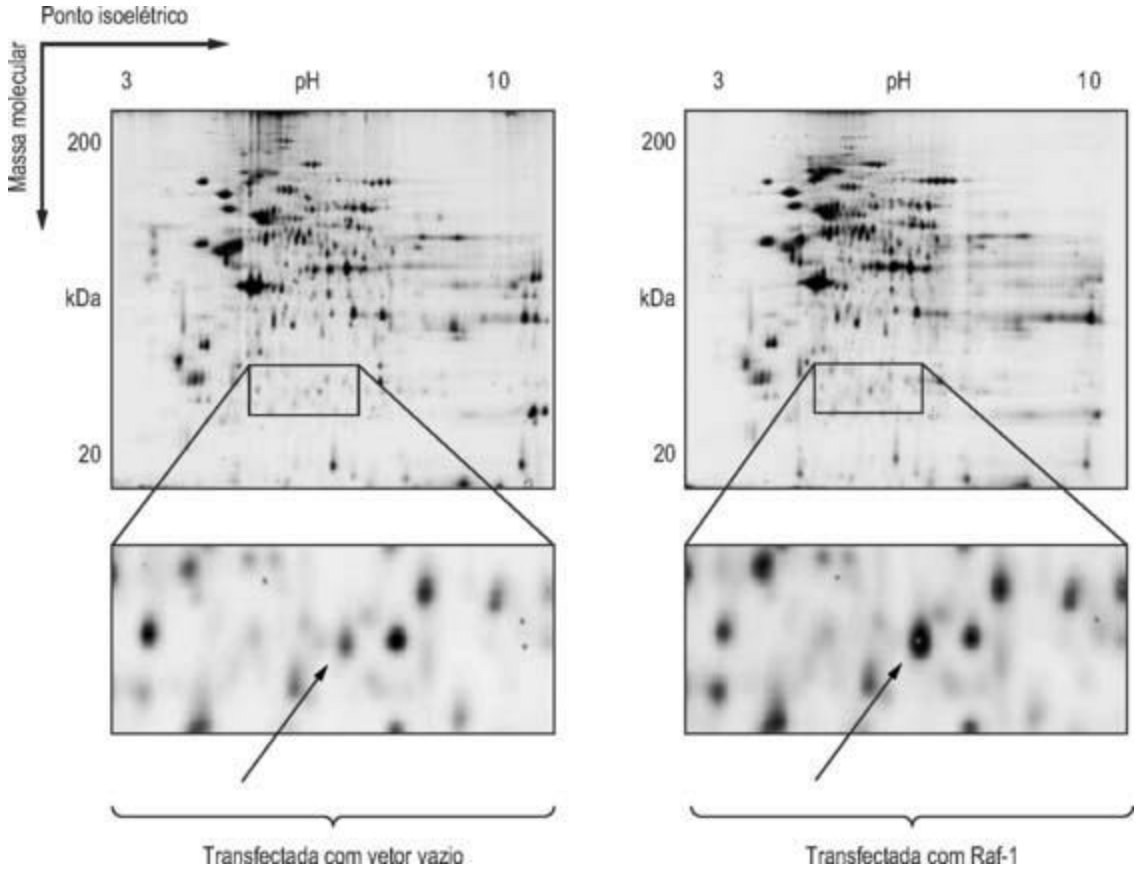


Fig. 36.8 Eletroforese em gel 2D. As células knock-out para Raf-1 foram transfectadas com um vetor vazio ou um vetor de expressão para Raf-1. Os lisados celulares foram analisados por eletroforese em gel 2D. Os géis parecem bem similares à primeira inspeção, mas a comparação detalhada mostra algumas proteínas que possuem alteração na abundância nessas células. A mancha destacada pela seta foi cortada do gel, a proteína digerida por tripsina e identificada como peroxiredoxina 4 por espectrometria de massas.

As proteínas nas manchas podem então ser identificadas pelo recorte das manchas presentes nos géis e de sua digestão com uma protease específica, normalmente a tripsina, que cliva em toda lisina e arginina na sequência (exceto onde o próximo resíduo é uma prolina). Isso gera uma quantidade de fragmentos de peptídeos que serão específicos daquela proteína. As massas moleculares dos fragmentos podem ser medidas usando a espectrometria de massas, frequentemente referidas como a "impressão digital da massa do peptídeo", e esses dados experimentais são comparados aos dados gerados ao tomar o genoma do organismo e realizar uma digestão enzimática teórica equivalente. A qualidade da comparação pode ser descrita estatisticamente e a probabilidade da identificação calculada. Isso leva à identificação mais provável da proteína (Fig. 36.9). Note que é muito difícil identificar todas as proteínas usando essa abordagem. A mistura de peptídeos pode também ser examinada em mais detalhes usando a cromatografia líquida associada à espectrometria de massas em série.

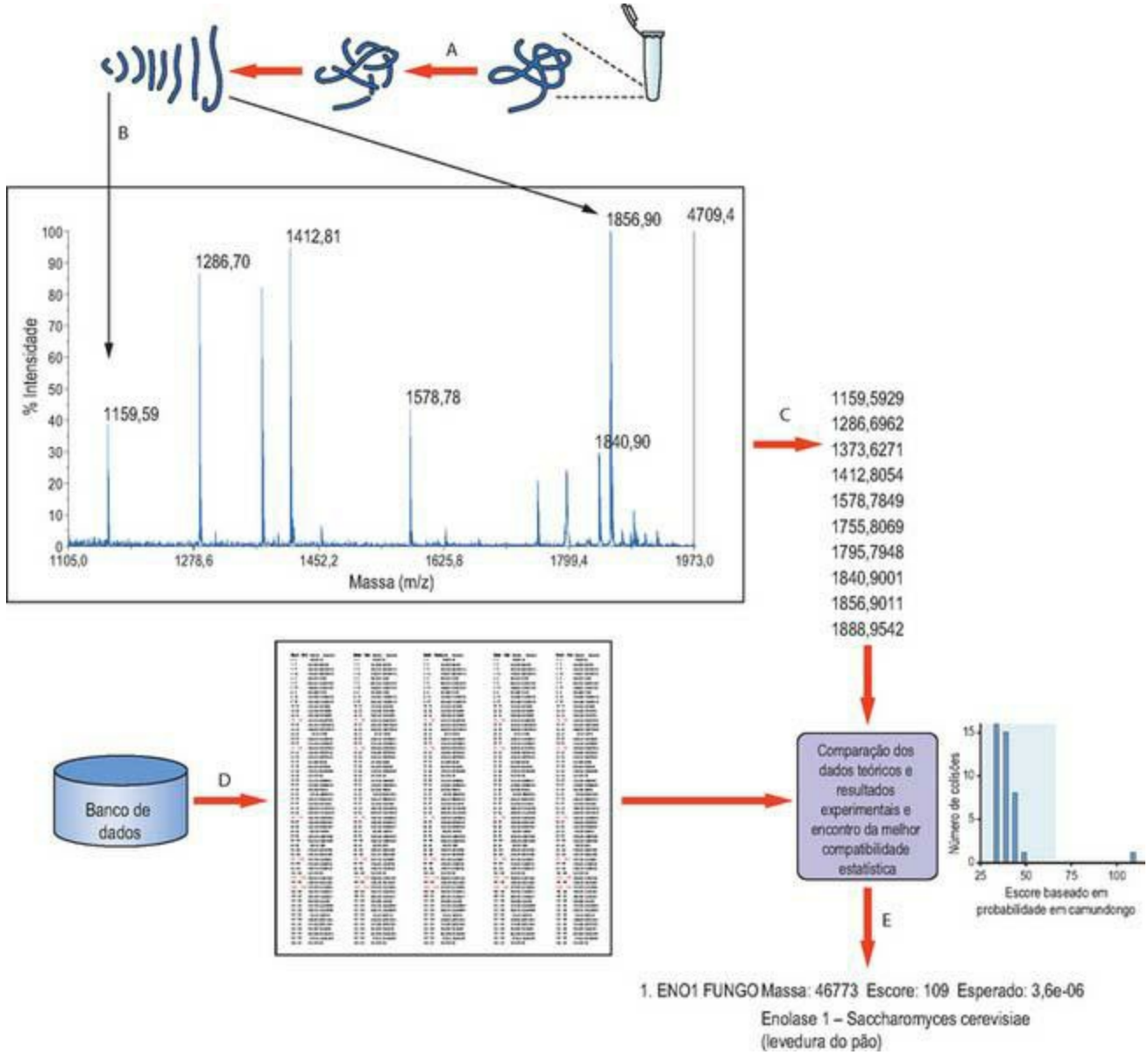


Fig. 36.9 Identificação das proteínas por fingerprinting da massa do peptídeo (PMF). Um fluxo de trabalho típico é mostrado: (A) a amostra é digerida com uma protease, geralmente a tripsina, para gerar um conjunto de peptídeos menores, que serão exclusivos da proteína; (B) a massa de um subconjunto dos peptídeos resultantes é mensurada usando a espectrometria de massa; (C) uma lista das massas experimentais observadas é gerada do espectro das massas; (D) um banco de dados das sequências proteicas é digerido teoricamente *in silico* e um conjunto de tabelas dos peptídeos esperados é gerada; (E) os dados experimentais são comparados com o banco de dados digerido teoricamente e um escore estatístico da adequação dos dados experimentais aos dados teóricos é gerado, fornecendo um escore de "segurança", que indica a probabilidade de identificação correta.

Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica usada pra determinar as massas moleculares das moléculas em uma amostra. Ela também pode ser usada para selecionar um componente individual de uma mistura, quebrar a sua estrutura química e medir as massas dos fragmentos, o que pode então ser usado para determinar a estrutura da molécula. Há muitos tipos diferentes de espectrometrômetros de massas disponíveis, mas os princípios subjacentes da espectrometria de massas são relativamente simples. O primeiro passo no processo é gerar moléculas carregadas, íons, das moléculas presentes na amostra. Isso pode ser atingido de forma relativamente simples para muitas biomoléculas solúveis

porque sua química polar provê grupos que são facilmente carregados. Por exemplo, a adição de um próton (H+) ao grupo da cadeia lateral nos aminoácidos básicos lisina e arginina gera uma molécula carregada positivamente. Quando uma molécula carregada é colocada em um campo elétrico, ela será repelida por um eletrodo de sinal similar e atraída por um eletrodo de sinal oposto, acelerando a molécula em direção ao eletrodo de carga oposta. Já que a força é igual para todas as moléculas, moléculas maiores acelerarão menos do que as moléculas pequenas (força = massa × aceleração), portanto moléculas pequenas terminarão tendo uma velocidade maior. Isso é utilizado para determinar a massa. Por exemplo, após as moléculas terem sofrido aceleração, o tempo que demoram para atingir certa distância pode ser medido e relacionado à sua massa, ao que se denomina espectrometria de massas de tempo de vôo (*time-of-flight*).

Um espectrometrômetro de massas em série de fato é composto por dois analisadores de espectrometria de massas unidos sequencialmente, com uma área entre eles, permitindo que as moléculas sejam fragmentadas. O primeiro analisador é usado para selecionar uma das moléculas de uma mistura com base em sua massa molecular, que então é quebrada em partes menores, geralmente por colisão com uma pequena quantidade de gás na região intermediária (denominada célula de colisão). Os fragmentos que são gerados são então analisados no segundo espectrometrômetro de massas (Fig. 36.10). Felizmente, os peptídeos tendem a se fragmentar na ligação peptídica, resultando em um espectro que possui picos separados pela massa do aminoácido na sequência correspondente, permitindo que essa abordagem seja usada para obter informações relacionadas à sequência dos peptídeos.

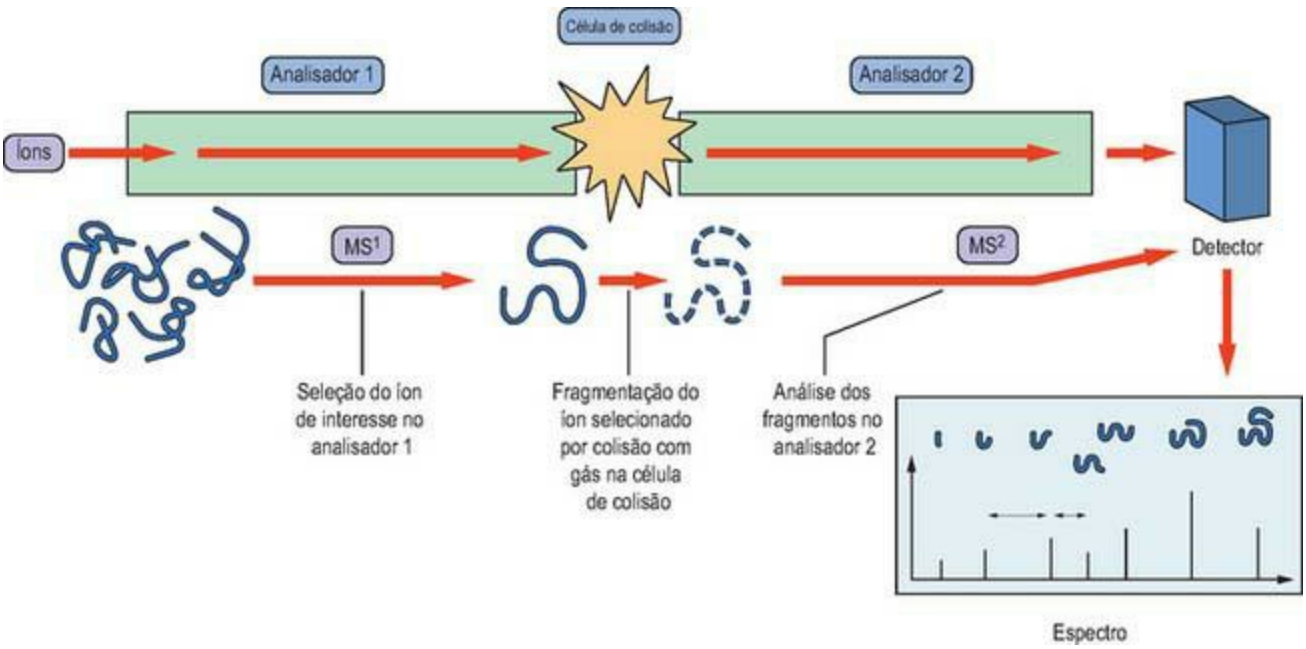


Fig. 36.10 Os princípios básicos da espectrometria de massas em série. Ver o texto para detalhes.

A cromatografia líquida pode ser associada ao espectrometrômetro de massas

A cromatografia líquida é um método alternativo ao 2DE. Ela separa misturas complexas com base em muitas propriedades físico-químicas diferentes, mais comumente na proteômica, pela carga da

molécula e de sua hidrofobicidade, usando a cromatografia de troca iônica ou a cromatografia de fase reversa, respectivamente. Isso pode ser atingido por meio dos grupamentos químicos que se ligam a uma resina particulada empacotada em uma coluna e depois despejando uma solução sobre o conjunto. As moléculas se ligarão à resina (a fase estacionária) com diferentes afinidades. Aquelas com uma alta afinidade demorarão mais para atravessar o comprimento da coluna e então eluirão da coluna depois de um tempo maior. As moléculas, portanto, são separadas de acordo com o tempo do fluxo que sai da coluna. A saída do sistema de cromatografia pode ser acoplada diretamente ao espectrometrômetro de massas, de forma que as moléculas que eluem da coluna podem ser monitoradas em tempo real.

A proteômica *shotgun* é uma alternativa para a eletroforese em gel bidimensional

J. R. Yates II desenvolveu uma alternativa para o 2DE, que ele denominou tecnologia de identificação de proteínas multidimensional (MuDPIT – multidimensional protein identification technology), mas métodos desse tipo comumente são chamados de análise de "*shotgun*". Nesse método, o conteúdo proteico total da amostra primeiro é digerido com uma protease específica para quebrá-la em peptídeos, e os peptídeos são então separados e identificados por cromatografia líquida multidimensional acoplada a um espectrometrômetro de massas (Fig. 36.11). Mesmo que os peptídeos de uma proteína possam estar espalhados por toda a amostra, a geração dos dados sequenciais por espectrometria de massas em série permite a identificação das proteínas. A abordagem é feita de maneira quantitativa de diversas formas. Se possível, as amostras podem ser cultivadas em um meio seletivo que provê um aminoácido essencial. A quantificação pode ser feita então da forma natural (a forma "leve") ou por marcação isotópica através de um isótopo estável (p. ex., 13C ou 2H, a forma "pesada"), o que faz com que todos os peptídeos que contêm esse aminoácido apareçam mais pesados no espectrômetro de massas. Isso é denominado SILAC (marcação com isótopos estáveis com aminoácidos em cultura de células, do inglês *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*). As amostras então são misturadas e analisadas usando a abordagem *shotgun*. As razões entre os peptídeos "pesados" e os equivalentes "leves" são usadas para determinar as quantidades relativas da proteína de que eles se derivaram.

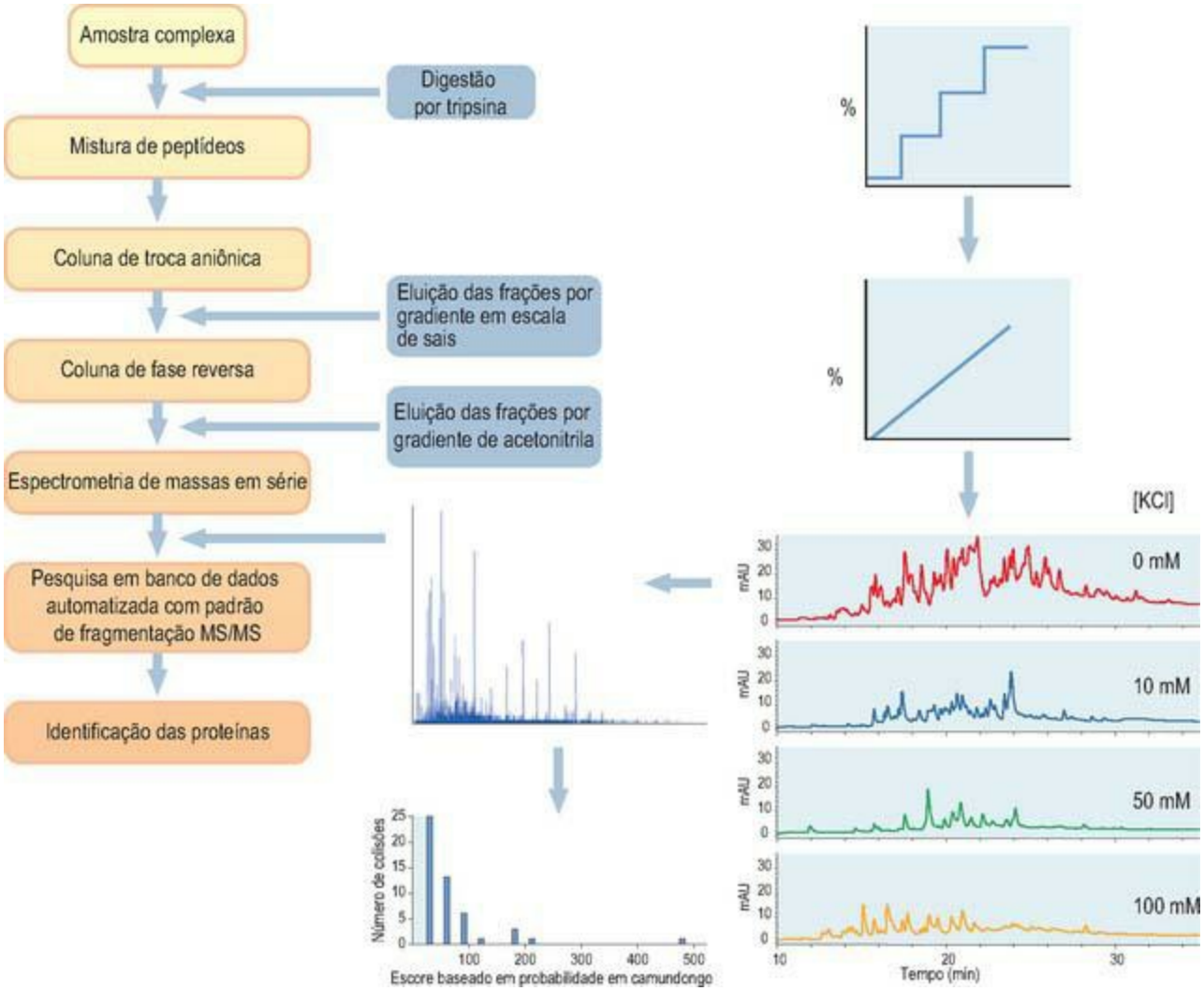


Fig. 36.11 A abordagem "shotgun". A cromatografia líquida bidimensional está ilustrada, usando um gradiente em escala para eluir as frações individuais da primeira dimensão que então são separadas na segunda dimensão. O acoplamento direto a espectrometria de massas em série permite que as proteínas sejam identificadas (compare com o quadro da pág. 16 e com a Figura 2.15).

Métodos alternativos incluem a reação química das proteínas presentes na amostra (usando, p. ex., o marcador de afinidade codificado com isótopo, ICAT) ou dos peptídeos após a digestão da amostra (p. ex., no iTRAQ), com um reagente químico "leve", ou um equivalente "pesado" marcado isotopicamente, misturando então as amostras e analisando-as como na abordagem para o SILAC. A vantagem dessa metodologia é que a análise é facilmente automatizada e que as abordagens podem ser usadas para obter informação sobre as proteínas que não funcionam bem na abordagem 2DE, tais como as proteínas de membrana, as proteínas pequenas e as proteínas com pIs extremos (como as histonas). A desvantagem é que as informações sobre as modificações pós-traducionais geralmente são perdidas, e a digestão da amostra gera uma amostra muito mais complexa para o processo de separação.

METABOLÔMICA

Os metabólitos são moléculas químicas pequenas, tais como os açúcares, os aminoácidos, os lipídeos e os nucleotídeos, presente em uma amostra biológica. O estudo do conteúdo de metabólitos de uma amostra é denominado metabolômica, enquanto que a mensuração quantitativa das alterações dinâmicas nos níveis dos metabólitos como consequência de um estímulo ou de outra alteração frequentemente é referida como metabonômica. As palavras metabolômica e metabonômica são frequentemente utilizadas de modo passível de troca, apesar de os puristas alegarem que ao mesmo tempo que ambas envolvem as mensurações multiparamétricas dos metabólitos, a metabonômica se dedica à análise das alterações dinâmicas dos níveis de metabólitos, enquanto a metabolômica enfoca a identificação e quantificação dos níveis em estado estável dos metabólitos intracelulares. Metabolômica é o termo geral mais comumente utilizado.

A metabolômica fornece outro nível de informação sobre um sistema biológico. Ela provê informação sobre os resultados da atividade de enzimas, que podem não depender da abundância da proteína isolada, já que podem ser modulados por uma provisão de substratos, pela concentração de cofatores ou de produtos e pelo efeito de outras moléculas pequenas ou proteínas que modulam a atividade da enzima (efetores). Em alguns aspectos, a metabolômica pode ser mais fácil do que a proteômica. No metaboloma, há uma amplificação de quaisquer alterações que ocorrem no proteoma, já que as enzimas alterarão muitas moléculas de substrato para cada molécula de enzima. Os métodos usados para procurar um metabólito em cada organismo serão os mesmos; uma vez que o metabólito seja idêntico, diferentemente das proteínas que são propensas a ter diferentes sequências nos diferentes organismos, as redes são mais constritas, tornado-as mais fáceis de seguir e a análise pode ser feita com um rendimento significativamente mais alto do que na proteômica. Em 2007, o Projeto do Metaboloma Humano liberou o primeiro esboço do metaboloma humano, consistindo em 2.500 metabólitos, 3.500 componentes alimentares e 1.200 drogas.

Os métodos mais utilizados para a investigação dos metabólitos são a espectrometria de massas, frequentemente em associação da cromatografia líquida, como usado na proteômica, e a espectroscopia por ressonância nuclear magnética (NMR). A identificação de sinais correspondentes a metabólitos específicos pode então ser usada para quantificar esses metabólitos em uma amostra complexa e para observar como eles se alteram. A metabolômica pode ser dividida em diversas áreas.

- ***Fingerprinting* metabólico**: significa fazer uma "fotografia" do metaboloma de um sistema, gerando um conjunto de valores para a intensidade de um sinal de uma espécie, sem necessariamente saber qual é essa espécie. Com frequência não há separação das espécies por cromatografia. Usada para descoberta de biomarcadores.

- **Perfil metabólito**: gerar um conjunto de dados quantitativos sobre uma quantidade de metabólitos, geralmente de identidade conhecida, ao longo de uma gama de condições ou períodos. Usada para a metabolômica, para metabonômica, para biologia dos sistemas e para descoberta de biomarcadores.

- **Análise de alvos metabólitos**: a mensuração da concentração de um metabólito específico ou de um pequeno conjunto de metabólitos ao longo de uma gama de condições e períodos.

Os biomarcadores são marcadores que podem ser usados na medicina para a detecção precoce, para o diagnóstico, para o estadiamento ou prognóstico da doença, ou ainda para a determinação da terapia mais efetiva

Um biomarcador é geralmente definido como um marcador que é específico para um estado particular de um sistema biológico. Os marcadores podem ser metabólitos, peptídeos, proteínas ou qualquer outra molécula biológica ou mensuração de propriedades físicas, por exemplo, a pressão sanguínea. A importância dos biomarcadores está aumentando rapidamente porque a tendência em direção à medicina personalizada será impossível de se manter sem uma caracterização detalhada e objetiva dos pacientes gerada pelos biomarcadores. Os biomarcadores podem surgir do processo patológico em si ou da reação do organismo à doença. Assim, eles podem ser encontrados nos fluidos e tecidos corpóreos. Pela facilidade de manejo da amostra e consentimento do paciente, a maioria dos estudos de biomarcadores usa a urina ou o plasma, apesar de a saliva, o fluido intersticial, o aspirado da papila mamária e o fluido cerebrospinal também serem usados.

ESPECTROSCOPIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (NMR) fornece informação estrutural útil sobre as moléculas que podem ser usadas para identificar os núcleos. Os núcleos atômicos se comportam como pequenos magnetos, portanto, quando são colocados em um forte campo magnético se alinham com o campo. A aplicação de uma energia apropriada (radiação eletromagnética por radiofrequência) faz com que o núcleo gire e alinhe contra o campo. Os núcleos então retornam ao seu estado básico quando cessa a irradiação, girando de volta e, à medida que o fazem, emitem frequências especificas de radiação. Elas podem ser gravadas e mostradas em um gráfico. Cada núcleo em uma molécula que possui um ambiente único emitirá uma frequência específica e núcleos unidos ou próximos no espaço interagem com os núcleos adjacentes (emparelhando) e isso também pode ser mensurado. Essa rica informação sobre a molécula permite que os elementos estruturais sejam determinados, e a amplitude dos sinais pode ser usada para quantificar de forma razoavelmente precisa a quantidade de material, o que é muito útil na metabolômica. A principal limitação é que o espectro de NMR rapidamente se torna congestionado com a informação de uma amostra complexa, portanto se requer uma alta resolução (advinda de todo campo magnético forte), sendo tal técnica relativamente insensível, com um limite de detecção de três a quatro ordens de magnitude menor do que o da espectrometria de massas.

Os métodos mais comuns para a descoberta de biomarcadores foram desenvolvidos daqueles usados na transcriptômica, proteômica e metabolômica, ou seja, arranjos gênicos, espectrometria de massas, frequentemente acoplada à cromatografia, e espectrometria por NMR. A descoberta de biomarcadores com frequência se faz em pequenos grupos de pacientes, mas, para serem clinicamente úteis, requere-se uma análise estatística robusta de um grande número de amostras de indivíduos saudáveis e doentes em estudos bem-controlados. Avanços nos métodos de análise estatística associados aos métodos de detecção, que podem diferenciar centenas a dezenas de

milhares de componentes individuais na amostra complexa, melhoraram a seletividade de forma tal que esses objetivos se tornaram alcançáveis. Geralmente, se faz necessário definir um número de marcadores que são específicos para uma dada doença para atingir seletividade, ao invés de simplesmente detectar uma resposta sistêmica geral, tal como uma resposta inflamatória ou uma doença fortemente relacionada. Em teoria, não se faz necessário realmente identificar qual é o biomarcador, apesar de ao fazê-lo poder surgir insights sobre a bioquímica subjacente à doença, e muitas autoridades reguladoras demandam que os marcadores sejam identificados antes de um método poder ser licenciado. Também pode permitir o desenvolvimento subsequente de ensaios mais baratos e de alto rendimento.

Alguns exemplos bem-conhecidos de biomarcadores são a mensuração dos níveis de glicose sanguínea no diabetes, o antígeno próstata específico para o câncer de próstata e os genes HER-2 ou BRCA1/2 no câncer de mama. A pesquisa de biomarcadores também pode elucidar os mecanismos de doença e outros marcadores ou alvos em potencial para drogas. Por exemplo, a abordagem de 2DE para determinar quais vias de reparo de DNA foram perdidas no câncer de mama levaou à descoberta de que os cânceres deficientes nos genes BRCA-1/2 são sensíveis à inibição de outra proteína de reparo do DNA, a PARP-1. Os inibidores PARP-1 se mostram promissores nos ensaios clínicos para o tratamento dos tumores deficientes em BRCA-1/2.

Resumo

- As abordagens -ômicas possuem um enorme potencial para avaliação de risco, detecção precoce, diagnóstico, estratificação e tratamento personalizado das doenças humanas.

- As tecnologias -ômicas estão sendo introduzidas na prática clínica, com a genômica e a transcriptômica liderando-as. Isso se deve principalmente ao fato de que o DNA e o RNA definiram as propriedades físico-químicas que são passíveis de amplificação e também a elaboração de plataformas de avaliação robustas compatíveis com as rotinas dos laboratórios clínicos. Por exemplo, a PCR é usada rotineiramente para estabelecer a paternidade e na medicina forense para determinar a identidade das amostras de DNA deixadas na cena de um crime. Testes genéticos para o diagnóstico de doenças hereditárias estão sendo feitos.

- Testes de microarranjo com base na transcriptômica para o câncer de mama foram aprovados e testes similares para outras doenças logo estarão disponíveis.

- A proteômica e a metabolômica requerem equipamento especializado e expertise, o que torna difícil de adaptá-los à rotina do laboratório clínico. Contudo, seu conteúdo de informação excede o da genômica e com progresso posterior na tecnologia, sua aplicação clínica se tornará realidade.

- Os benefícios das tecnologias -ômica são óbvios, principalmente na avaliação do risco e na elaboração de tratamentos personalizados. Contudo, há também enormes implicações éticas inerentes ao uso dessa informação, e novas orientações reguladoras serão necessárias.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Por que a informação aumenta quando se passa do estudo dos genes para o estudo das proteínas?

2. Por que a genômica e a proteômica necessitam de tecnologias fundamentalmente diferentes?

3. Por que a proteômica e a metabolômica podem usar tecnologias similares?

4. O que é um biomarcador, por que os biomarcadores são importantes e quais são suas potenciais aplicações?

Leituras sugeridas

Carrette O, Burkhard PR, Sanchez JC, Hochstrasser DF. State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research. *Nat Protocols*. 2006;1:812-823.

Chapman EJ, Carrington JC. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet*. 2007;8:884-896.

Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev*. 2007;26:51-78.

Fenselau C. A review of quantitative methods for proteomic studies. *J Chromatograph B-Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;855:14-20.

Hollywood K, Brison DR, Goodacre R. Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics*. 2006;6:4716-4723.

International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431:931-945.

Jordan KW, Cheng LL. NMR-based metabolomics approach to target biomarkers for human prostate cancer. *Exp Rev Proteomics*. 2007;4:389-400.

Kolch W, Mischak H, Pitt AR. The molecular make-up of a tumour: proteomics in cancer research. *Clin Sci (Lond)*. 2005;108:369-383.

McDonald WH, Ohi R, Miyamoto DT, et al. Comparison of three directly coupled HPLC MS/MS strategies for identification of proteins from complex mixtures: single-dimension LC-MS/MS, 2-phase MudPIT, and 3-phase MudPIT. *Int J Mass Spectrom*. 2002;219:245-251.

O'Connor M. Novel biomarkers for DNA damage response pathways: insights and applications for cancer therapy. *Proteomics*. 2006;6(suppl2):69-71.

Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. *Electrophoresis*. 1995;16:1090-1094.

Sites

Projeto Metaboloma Humano. www.metabolomics.ca/.

Projeto HapMap internacional. www.hapmap.org/.

Online Mendelian Inheritance in Man. www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM.

MIAME, MIAME. WWW.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html

Instituto nacional do câncer dos Estados Unidos. www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/CGAP.

Wellcome Trust Sanger Centre (Reino Unido). www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Studies/.

Oxigênio e Vida

J.W. Baynes

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Identificar as principais espécies reativas de oxigênio (ROS) e suas fontes intracelulares.
- Identificar os alvos dos danos do oxigênio reativo e descrever os efeitos das ROS sobre as biomoléculas.
- Identificar as principais enzimas antioxidantes, vitaminas e biomoléculas que protegem contra as ROS.
- Descrever o papel do oxigênio reativo na regulação biológica e nas defesas imunológicas.
- Explicar o papel das ROS no desenvolvimento de doenças crônicas e inflamatórias.

INTRODUÇÃO

O elemento oxigênio (O_2) é essencial para a vida dos organismos aeróbios (Cap. 5). Embora ele seja altamente reativo nas reações de combustão a alta temperatura, o oxigênio é relativamente inerte na temperatura do corpo; ele necessita de uma elevada energia de ativação nas reações de oxidação. Isso nos favorece, pois de outra forma poderíamos entrar espontaneamente em combustão. Cerca de 90% do oxigênio que usamos está comprometido com a fosforilação oxidante. Enzimas que usam O_2 para reações de hidroxilação e oxigenação consomem outros 10% e uma fração residual, < 1%, é convertida em espécies reativas de oxigênio (ROS), como o superóxido e o peróxido de hidrogênio, que são formas reativas do oxigênio. ROS são importantes para o metabolismo – algumas enzimas usam H_2O_2 como um substrato. As ROS também desempenham um papel na regulação do metabolismo e nas defesas imunológicas contra infecções. Entretanto, as ROS são também fonte de dano crônico para as biomoléculas dos tecidos. Um dos riscos do aproveitamento do O_2 como substrato para o metabolismo energético é que podemos acabar, e de fato acabamos, queimados. Por esta razão temos uma gama de defesas antioxidantes que nos protege contra as ROS.

Este capítulo lidará com a bioquímica do oxigênio reativo, com os mecanismos de formação e desintoxicação das ROS e com seu papel na doença e saúde humanas.

A NÃO REATIVIDADE DO OXIGÊNIO

Na maioria dos livros textos, o oxigênio é mostrado como uma molécula diatômica com duas ligações entre átomos de oxigênio. Esta é uma representação atraente do ponto de vista das estruturas eletrônicas por pontos e do emparelhamento eletrônico para formar as ligações químicas, mas está incorreta. Na verdade, à temperatura corporal, O_2 é um birradical, uma molécula com dois elétrons desemparelhados (Fig. 37.1). Estes elétrons têm *spins* paralelos e são desemparelhados. Já que a maioria das reações de oxidação, por exemplo, a oxidação de um alcano a álcool ou de um aldeído a ácido, são reações de oxidação de dois elétrons, O_2 não é em geral muito reativo nessas reações. De fato, ele é completamente estável, mesmo na presença de um redutor forte como o H_2. Quando bastante calor (energia de ativação) é aplicado, um dos elétrons desemparelhados salta para formar um par de elétrons, que então participa na reação de combustão. Uma vez iniciada, a combustão fornece o calor necessário para propagar a reação, por vezes de modo explosivo.

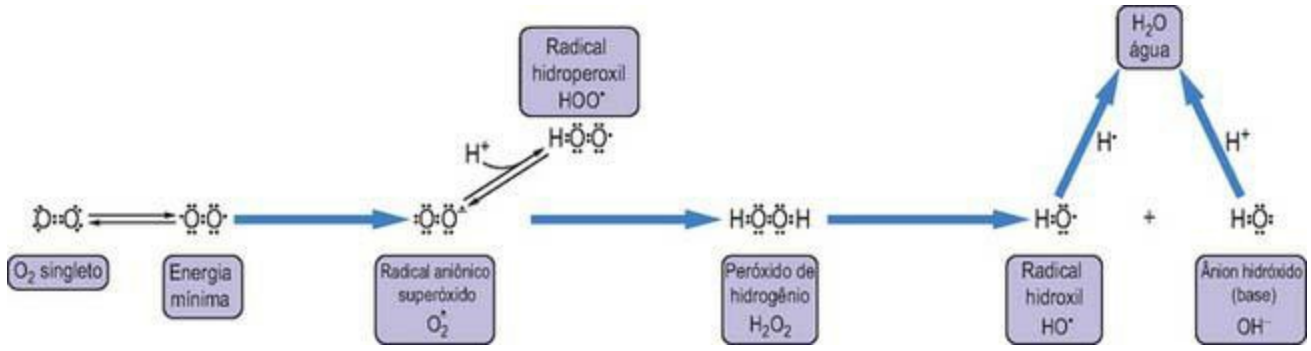


Fig. 37.1 Estrutura do oxigênio e espécies reativas de oxigênio (ROS). O oxigênio é mostrado à extrema esquerda com sua forma diatômica incorreta. Tal forma, conhecida como oxigênio singleto existe em proporção significativa somente em altas temperaturas e em resposta à radiação. O dirradical é a forma natural de ocorrência com energia mínima (*ground-state*) do O_2 em temperatura corporal. As ROS são formas reativas, parcialmente reduzidas, do oxigênio. O primeiro produto de redução é o radical aniônico superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que está em equilíbrio com o ácido fraco, radical hidroperoxil (pKa aproximadamente 4,5). A redução do superóxido produz o hidroperóxido O_2^{-2}, na forma de H_2O_2. A redução do H_2O_2 causa uma reação de quebra hemolítica que libera o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) e íon hidróxido (OH^-). A água é o produto final da redução completa do O_2.

Reações metabólicas acontecem à temperatura corporal, muito abaixo da temperatura requerida para ativar o oxigênio livre. Nas reações biológicas de oxirredução envolvendo o O_2, o oxigênio é sempre ativado por íons metálicos redox ativos, tais como ferro e cobre; esses metais têm também pares de elétrons desemparelhados e formam complexos oximetálicos reativos. Todas as enzimas que usam O_2 *in vivo* são metaloenzimas e, na verdade, mesmo as proteínas que transportam oxigênio, hemoglobina e mioglobina, contêm ferro no grupo heme (Cap. 5). Estes íons metálicos fornecem um elétron de cada vez ao oxigênio, ativando o O_2 para o metabolismo. Devido ao fato que o ferro e o cobre, e algumas vezes o manganês e outros íons, ativam o oxigênio, esses íons metálicos redox ativos são mantidos livres em concentrações muito baixas (submicromolares) *in vivo*. Em geral são firmemente sequestrados (compartimentalizados) em uma forma inativa por proteínas de transporte e armazenamento, sendo ativados *in loco* nos sítios ativos das enzimas onde a química da oxidação

pode ser contida e orientada para ocorrer sobre um substrato específico. Íons metálicos redox ativos livres são perigosos para os sistemas biológicos porque, na forma livre, eles ativam O_2 e as ROS geradas causam danos oxidantes à s biomoléculas. O dano à s proteínas é frequentemente sítio-específico, ocorrendo nos sítios em que os metais se ligam à s proteínas, o que sugere que os complexos oximetálicos participam dos danos provocados pelas ROS *in vivo*.



SOBRECARGA DE FERRO AUMENTA O RISCO PARA DIABETES E CARDIOMIOPATIA

Pacientes com desordens hematológicas como a hemocromatose hereditária, talassemias e anemia falciforme, ou que receberam frequentes transfusões de sangue, desenvolvem gradualmente sobrecarga de ferro, uma condição que aumenta o risco de desenvolvimento de cardiomiopatia e diabetes. O coração e as células β são ricos em mitocôndrias. O desenvolvimento de uma doença secundária na presença de sobrecarga de ferro é considerado o resultado do aumento da produção de ROS mitocondrial, mediado por ferro, nestes tecidos. Mutações no genoma mitocondrial podem levar a disfunção progressiva da mitocôndria, comprometendo a função cardíaca e das células β (quadro da pág. 299).

ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDANTE

ROS são formas reativas de oxigênio fortemente oxidantes

O estresse oxidante (OxS) é definido como uma condição em que a taxa de geração das ROS excede nossa capacidade de nos protegermos delas, dando origem a um aumento dos danos oxidantes à s biomoléculas (Fig. 37.2). O OxS é uma característica típica das doenças inflamatórias em que células do sistema imune produzem ROS em resposta a um desafio. OxS pode ser localizado, por exemplo, nas juntas sob artrite ou na parede vascular na aterosclerose, ou pode ser sistêmico, por exemplo, no lúpus eritematoso sistêmico (SLE) ou no diabetes.



Fig. 37.2 Estresse oxidante: um desequilíbrio entre sistemas pró-oxidantes e antioxidantes. Como descrito neste capítulo, numerosos fatores contribuem para o aumento e a inibição do estresse oxidante. AGE, produto final da glicosilação avançada; CAT, catalase; GPx, glutationa peroxidase; MPO, mieloperoxidase; SOD, superóxido dismutase.

Dentre as ROS, mesmo que em concentrações micromolares ou menores, o H_2O_2 é a que se apresenta no sangue e nos tecidos em maior concentração. H_2O_2 é relativamente estável; pode ser armazenado no laboratório ou no estojo de remédios por anos, mas se decompõe na presença de íons metálicos redox ativos. O radical hidroxil ($OH^{\cdot}$) é a espécie mais prejudicial e reativa; sua meia-vida, medida em nanossegundos, é limitada pela difusão, isto é, determinada pelo tempo de colisão com uma biomolécula-alvo. O superóxido ($O_2^{\cdot-}$) está na posição intermediária em termos de estabilidade e pode, na verdade, servir ou como um agente oxidante, dando origem ao H_2O_2, ou redutor, dando origem ao O_2. No pH fisiológico o radical hidroperoxil ($HOO^{\cdot}$, pKa ≈ 4,5), a forma protonada do superóxido (Fig. 37.1), representa somente uma pequena fração do total de $O_2^{\cdot-}$ (cerca de 0,1%), mas apresenta reatividade intermediária entre a do $O_2^{\cdot-}$ e do $OH^{\cdot}$. $HOO^{\cdot}$ e H_2O_2 são pequenas moléculas não carregadas que difundem prontamente através das membranas celulares.

ROS são formadas por três principais mecanismos *in vivo*: por reação do oxigênio com íons metálicos descompartimentalizados (Fig. 37.3); como uma reação colateral do transporte de elétrons nas mitocôndrias (Fig. 37.4); ou por reações enzimáticas normais, por exemplo, formação de H_2O_2 por oxidases de ácidos graxos no peroxissoma (Cap. 15). ROS secundárias são também formadas por reações enzimáticas, por exemplo, pela mieloperoxidase que nos macrófagos catalisa a reação do H_2O_2 com Cl^- para produzir outra ROS, o ácido hipocloroso (HOCl). O HOCl, que é a principal espécie oxidante dos alvejantes baseados em cloro, é também parte da maquinaria bactericida do macrófago (a seguir).

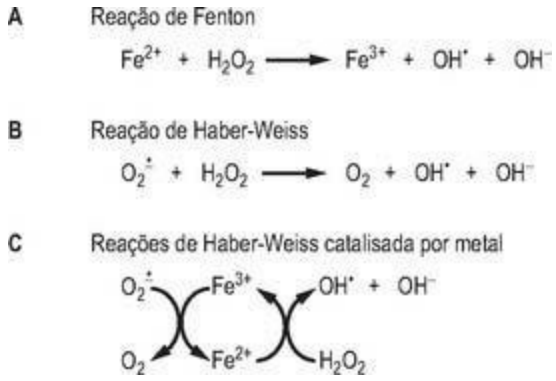


Fig. 37.3 Formação de ROS pelas reações de Fenton e Haber-Weiss. (A) Fenton descreveu pela primeira vez o poder oxidante de soluções de Fe^{2+} e H_2O_2. Essa reação gera o forte oxidante $OH^{\cdot}$. Cu^+ catalisa a mesma reação. (B) A reação de Haber-Weiss descreve a produção de a partir $OH^{\cdot}$ de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2. (C) Nas condições fisiológicas a reação de Haber-Weiss é catalisada por íons metálicos redox ativos.

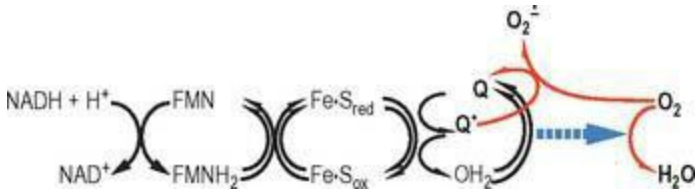


Fig. 37.4 Formação de superóxido pela mitocôndria. Depois da oxidação do NADH, a cadeia de transporte de elétrons catalisa reações redox de um único elétron. O radical semiquinona, um intermediário da redução da Q em QH_2 pelos complexos I e II, é sensível à oxidação pelo oxigênio molecular e é considerado a fonte principal dos radicais superóxidos nas células. Essa reação é aumentada em alta tensão de oxigênio e também em baixa tensão de oxigênio, por exemplo, durante a lesão por isquemia/reperfusão (quadro da pág. 504) quando o NADH está aumentado, a cadeia transportadora de elétrons fica saturada de elétrons e o potencial de membrana está elevado.

RADIOTERAPIA: APLICAÇÃO MÉDICA DO OXIGÊNIO REATIVO

A terapia por radiação usa um feixe focalizado de elétrons altamente energizados ou raios γ de uma fonte de raios X ou de cobalto-60 para destruir o tecido tumoral. A radiação produz um fluxo de radicais hidroxil (da água) e radicais orgânicos no local do tumor. O estresse oxidante causado no local produz dano a todas as biomoléculas no interior das células tumorais, mas o dano ao DNA é decisivo – é o que previne a replicação da célula tumoral, inibindo o crescimento do tumor. A

irradiação é também usada como método para esterilização de comida, destruindo bactérias e vírus contaminantes ou infestações de insetos, o que preserva os produtos alimentares durante a estocagem por longos períodos. A exposição a radiação ionizante vinda de explosões nucleares ou acidentes, inalação ou ingestão de elementos radioativos como o gás radônio ou o estrôncio-90, também causa danos oxidantes ao DNA. As células que sobrevivem ao dano podem vir a apresentar mutações no DNA que por fim conduzirão ao desenvolvimento de cânceres. As leucemias são particularmente prevalentes por causa da rápida divisão das células da medula óssea.

TOXICIDADE DA HIPEROXIA

A terapia por suplementação com oxigênio pode ser usada para o tratamento de pacientes com hipoxemia, angústia respiratória, ou em consequência da exposição ao monóxido de carbono. Sob condições normobáricas a fração do oxigênio no ar pode ser aumentada para perto de 100% usando uma máscara facial ou uma cânula nasal. Entretanto, pacientes desenvolvem dor torácica, tosse e dano alveolar dentro de poucas horas de exposição a 100% de oxigênio. O edema desenvolve-se gradualmente vindo a comprometer a função pulmonar. O dano é resultado da superprodução de ROS nos pulmões. Ratos podem ser protegidos da toxicidade do oxigênio pelo gradual aumento da tensão de oxigênio ao longo de vários dias. Durante esse tempo enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, são induzidas nos pulmões e fornecem proteção aumentada contra a toxicidade do oxigênio.

O pulmão não é o único tecido afetado pela hiperoxia. Crianças pré-maturas, especialmente aquelas com síndrome da angústia respiratória aguda (Cap. 27), requerem frequentemente suplementação de oxigênio para sobreviver. Durante os anos 1950, reconheceu-se que a alta tensão de oxigênio usadas nas incubadoras para crianças pré-maturas aumentava o risco de cegueira, por causar a retinopatia do prematuro (fibroplasia retrolental).

LESÃO POR ISQUEMIA/REPERFUSÃO: UM PACIENTE COM INFARTO DO MIOCÁRDIO

Um paciente sofreu um grave infarto do miocárdio, que foi tratado com ativador do plasminogênio tecidual, uma enzima capaz de dissolver coágulos (trombolítica). Durante os dias que se seguiram à hospitalização, o paciente experimentou palpitações, batimento irregular rápido do coração, associado a fraqueza e desfalecimento. O paciente foi tratado com agentes antiarrítmicos.

Comentário. Isquemia, significando fluxo limitado de sangue, é uma condição na qual um tecido é privado de oxigênio e nutrientes. Os danos ao tecido cardíaco durante um infarto do miocárdio ocorrem não durante a fase isquêmica ou de hipoxia, mas durante a reoxigenação do tecido. Esse tipo de dano também ocorre depois de transplantes e cirurgias cardiovasculares. ROS são consideradas importantes na lesão por reperfusão. Quando as células são privadas de oxigênio elas são forçadas a depender da glicólise anaeróbia e do estoque de glicogênio para a síntese de ATP. NADH e lactato acumulam, enquanto todos os componentes do sistema de transporte mitocondrial de elétrons ficam saturados com elétrons (reduzidos), porque estes não podem ser transferidos para o oxigênio. O

potencial da membrana das mitocôndrias é aumentado (hiperpolarizado) e, quando o oxigênio é reintroduzido, grandes quantidades de ROS são rapidamente produzidas, superando as defesas antioxidantes. ROS fluem por toda a célula, danificando os lipídeos da membrana, o DNA e outros constituintes vitais para as células, o que leva a necrose. Suplementos com antioxidantes e drogas estão sendo avaliados para proteção dos tecidos antes de transplantes, durante cirurgias e durante a recuperação da isquemia.

ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO

A óxido nítrico sintase (NOS) catalisa a produção do radical livre óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) do aminoácido L-arginina. Existem três isoformas de NOS: nNOS no tecido neuronal, no qual o $NO^{\cdot}$ serve como neurotransmissor; iNOS no sistema imune, onde está envolvido na regulação da resposta imune; e a eNOS nas células endoteliais, onde o $NO^{\cdot}$, conhecido como o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), tem função na regulação do tônus vascular.

Numa reação colateral, $NO^{\cdot}$ reage com $O_2^{\cdot-}$ para formar o forte oxidante, peroxinitrito ($ONOO^-$), uma espécie reativa de nitrogênio (RNS) que tem muitas das fortes propriedades oxidantes do $OH^{\cdot}$, mas que tem uma meia-vida biológica mais longa. $ONOO^-$ é também um potente agente de nitração; existem evidências de que ONOOH se degrada, em parte, por clivagem homolítica, para produzir duas espécies reativas $OH^{\cdot}$ e $NO_2^{\cdot}$. A produção simultânea de NO^- e $O_2^{\cdot-}$, com aumento concomitante do $ONOO^-$ e um decréscimo do $NO^{\cdot}$, é considerada capaz de limitar a vasodilatação e de causar inflamação da parede vascular durante a lesão por isquemia/reperfusão, criando as condições para a doença vascular. $NO_2^{\cdot}$, outra RNS com intensa atividade de oxidação e nitração é formada pela peroxidase dos eosinófilos ou pela oxidação do $NO^{\cdot}$ pelo H_2O_2 catalisada pela mieloperoxidase.

A NATUREZA DO DANO CAUSADO POR RADICAIS DE OXIGÊNIO

O radical hidroxil é o mais prejudicial e o mais reativo de todas as ROS

A reação das ROS com biomoléculas resulta em produtos característicos, descritos como biomarcadores do estresse oxidante. Esses compostos podem ser formados diretamente na reação de oxidação com a ROS, ou por reações secundárias entre produtos de oxidação e outras biomoléculas. O radical hidroxil reage com biomoléculas primeiro por reações de retirada e adição de hidrogênio. Um dos sítios mais sensíveis aos danos por radicais livres são as membranas das células, que são ricas em ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) passíveis de pronta oxidação. Danos peroxidantes sobre a membrana plasmática afetam a integridade e a função da membrana, comprometendo a capacidade da célula em manter gradientes iônicos e assimetria dos fosfolipídeos da membrana. Como mostrado na Figura 37.5, quando $OH^{\cdot}$ retira o átomo de hidrogênio de um PUFA, inicia-se uma cadeia de reações de peroxidação de lipídeos, da qual participam produtos de oxidação secundários, peróxidos de lipídeos e radicais peroxil de lipídeos. Os produtos de oxi dação dos lipídeos formados nessa reação se degradam para formar compostos reativos, como o dialdeído malônico (MDA) e o hidroxinonenal (HNE). Esses dois compostos reagem com proteínas para formar adutos e ligações cruzadas, conhecidos como produtos finais da lipoxidação avançada (ALE). Adutos de MDA e HNE em resíduos de lisina têm sido mensurados em lipoproteínas da parede vascular na aterosclerose e na placa neuronal da doença de Alzheimer, implicando estresse e danos oxidantes na patogênese destas doenças.

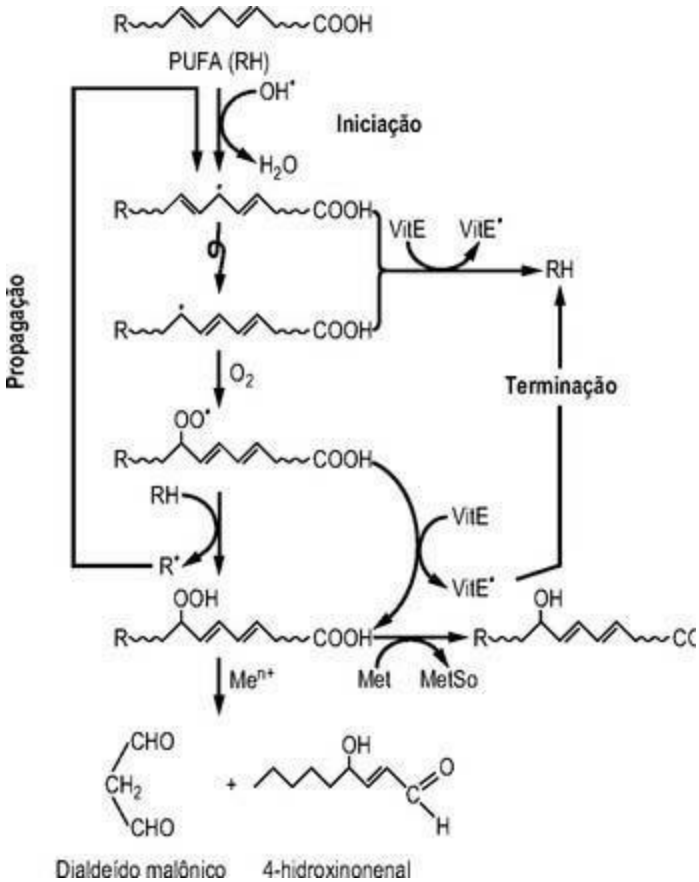


Fig. 37.5 Via da peroxidação dos lipídeos. $OH^{\cdot}$ ataca PUFA, formando um radical de lipídeo no carbono central. O radical se

rearranja para formar um radical conjugado dienil. Esse radical reage com O_2 do ambiente, formando um radical hidroperoxil, que então retira um hidrogênio de um lipídeo vizinho para formar um peróxido de lipídeo e um $R^{\cdot}$, que dá início a uma reação em cadeia. Essa reação continua até que o suprimento de PUFA acabe exaurido, a menos que ocorra uma reação de terminação. A vitamina E (a seguir) é o principal antioxidante para extinção da reação em cadeia nas membranas; ela reduz o radical conjugado dienil e o radical hidroperoxil, extinguindo a cadeia ou o ciclo das reações de peroxidação de lipídeos. Os peróxidos de lipídeos podem eventualmente também serem reduzidos por resíduos de metionina das lipoproteínas, o que forma sulfóxido de metionina e álcoois de lipídeos. Caso contrário, os peróxidos de lipídeos decompõem dando origem a uma gama de "espécies carbonila reativas", como o dialdeído malônico e o hidroxinonenal, que reagem com proteínas para formar os produtos finais de lipoxidação avançada (ALE), que são biomarcadores de estresse oxidante. O esquema de reação mostrado aqui para os PUFA também ocorre com fosfolipídeos intactos e ésteres de colesterol nas lipoproteínas e nas membranas celulares.

Radicais hidroxil também reagem por adição à fenilalanina, tirosina e bases dos ácidos nucleicos para formar derivados hidroxilados e ligações cruzadas (Fig. 37.6). Outras ROS e RNS deixam pistas, como a nitrotirosina formada do ONOOH e a clorotirosina formada do HOCl, e o sulfóxido de metionina, formado pela reação do H_2O_2 ou do HOCl com resíduos de metionina das proteínas (Fig. 37.6). A nitrotirosina, como os ALE, está aumentada nas placas ateroscleróticas e de Alzheimer.

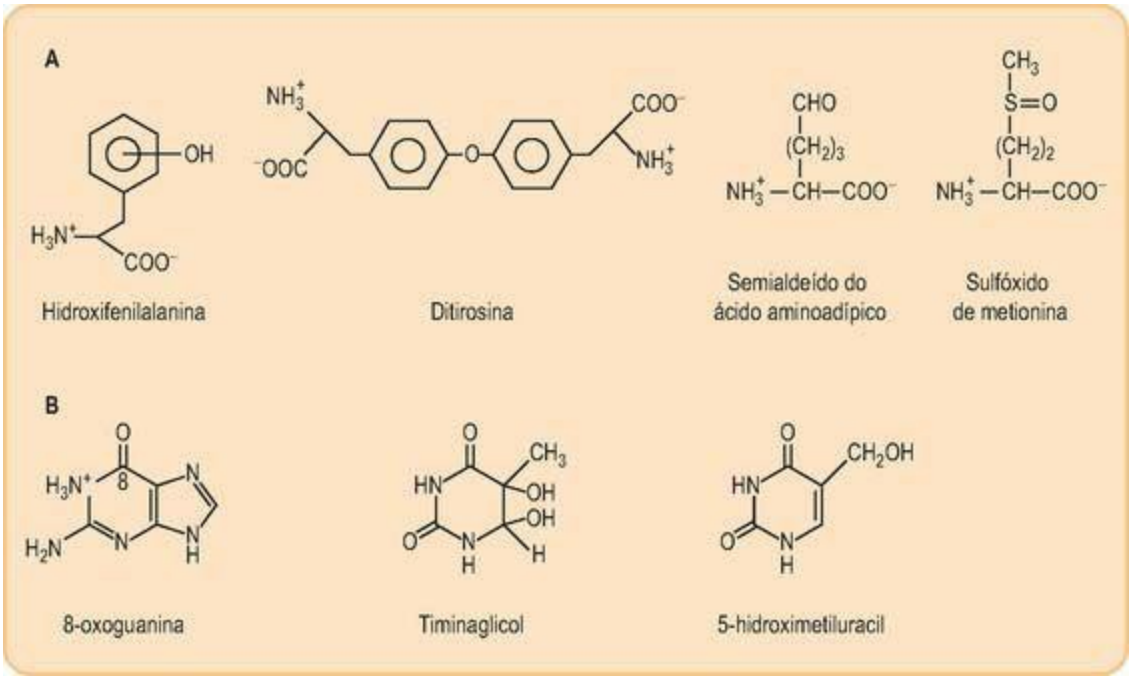


Fig. 37.6 Produtos do dano dos radicais hidroxil à s biomoléculas. (A) Produtos da oxidação de aminoácidos: *o*-, *m*- e *p*-tirosina e ditirosina originados dos danos à fenilalanina; o semialdeído do ácido aminoadípico vem da lisina; o sulfóxido da metionina. Outros produtos incluem clorotirosina (do HOCl), nitrotirosina (do $ONOO^-$ e do $NO_2^{\cdot}$), di-hidroxifenilalanina produzida pela hidroxilação da tirosina e hidroperóxidos de aminoácidos alifáticos, tais como o hidroperóxido de leucina. (B) Produtos de oxidação de ácidos nucleicos: 8-oxoguanina é o indicador mais comumente mensurado do dano ao DNA.

ROS também reagem com carboidratos para formar compostos carbonila reativos que reagem com proteínas formando ligações cruzadas e adutos, conhecidos como produtos de glicoxidação ou produtos finais da glicosilação avançada (AGE). AGEs estão aumentados em proteínas teciduais no diabetes como um resultado da hiperglicemia e do estresse oxidante, e o aumento na modificação química de proteínas por AGEs e ALEs está implicado no desenvolvimento das complicações vascular, renal e da retina decorrentes do diabetes (Cap. 21).

FUNÇÀO SENTINELA DA METIONINA

Os resíduos de metionina (Met) das proteínas podem ser oxidados a sulfóxido de metionina (MetSO) por H_2O_2 ou HOCl. A metionina está em geral na superfície das proteínas e raramente tem papel no sítio ativo ou no mecanismo de ação das enzimas. Entretanto, existem evidências de que ela funciona como um "peão antioxidante", protegendo o sítio ativo das enzimas. Dos resíduos de Met da glutamina sintetase, a metade pode ser oxidada sem afetar a atividade específica da enzima. Esses resíduos são arranjados em uma fileira que "monta guarda" na entrada do sítio ativo, o que protege a enzima contra inativação por ROS. MetSO pode ser reduzido para refazer a metionina pela enzima metionina sulfóxido redutase, o que provê uma amplificação catalítica do potencial antioxidante de cada resíduo de metionina.

OXIDAÇÀO DA METIONINA E ENFISEMA

A α_1-antitripisina (A1AT) é uma proteína do plasma sintetizada e secretada pelo fígado. É um inibidor potente da elastase e protege os tecidos dos danos causados pela enzima secretada por neutrófilos durante uma inflamação. A deficiência dessa proteína (cerca de 1 em 4.000 no mundo todo) está comumente associada ao enfisema, à doença progressiva dos pulmões e também ao dano hepático que resulta da acumulação de agregados de proteínas. O dano pulmonar é atribuído à falha da A1AT em inibir a elastase liberada por macrófagos dos alvéolos durante a fagocitose de partículas de poeira trazidas pelo ar. O tratamento inclui terapia de reposição por infusão intravenosa semanal de um concentrado purificado de plasma ou da proteína recombinante. Fumar cigarros e a exposição à poeira mineral (carvão, sílica) exacerba a patologia em pacientes com deficiência de A1AT, mas também são fatores de risco independentes para o enfisema e a fibrose pulmonar. A fumaça do cigarro e a matéria microparticulada ativam os macrófagos pulmonares, provocando liberação de enzimas proteolíticas e aumento da produção de ROS como resultado da inflamação. As ROS causam oxidação de um resíduo específico de Met na A1AT, o que inibe irreversivelmente a atividade antielastase dessa proteína. Níveis aumentados de inativa A1AT contendo Met(O) estão presentes no plasma de fumantes crônicos.

DEFESAS ANTIOXIDANTES

Existem vários níveis de proteção contra o dano oxidante

Os danos das ROS aos lipídeos e proteínas são reparados amplamente por degradação e ressíntese. Proteínas oxidadas, por exemplo, são alvos preferidos para degradação proteossômica, e um DNA danificado é reparado por numerosos mecanismos de excisão e reparação. Tais processos não são perfeitos. Algumas proteínas, como os colágenos e as proteínas do cristalino, sofrem lenta renovação, de tal forma que o dano acumula e suas funções podem ser atrapalhadas, por exemplo, o escurecimento dependente da idade das proteínas do cristalino, as ligações cruzadas da elastina e do colágeno e a perda da elasticidade ou mudanças na permeabilidade da parede vascular e da membrana basal renal (Cap. 44). A associação entre inflamação crônica e câncer indica que a exposição crônica à s ROS causa danos cumulativos no genoma na forma de mutações não letais no DNA.

Nossa primeira linha de defesa contra o dano oxidante é a captação ou quelação dos íons metálicos redox ativos

Quelantes endógenos incluem numerosas proteínas ligantes de metais que aprisionam ferro e cobre na forma inativa, como a transferrina e a ferritina, formas de transporte e estocagem do ferro. A proteína do plasma haptoglobina liga na hemoglobina proveniente de eritrócitos rompidos e descarrega a molécula de hemoglobina para o fígado catabolizá-la. A hemopexina do plasma liga o heme, a forma lipídeo-solúvel do ferro, que catalisa a formação de ROS nos ambientes lipídicos; ela descarrega o heme no fígado para catabolismo. Albumina, a principal proteína do plasma, tem um sítio para ligar fortemente o cobre e inibe efetivamente as oxidações catalisadas por cobre no plasma. A carnosina (β-alanil-L-histidina) e peptídeos parecidos estão presentes no músculo e no cérebro em concentrações milimolares; eles são potentes quelantes de cobre e podem ter um papel na proteção antioxidante intracelular.

RESPOSTA CELULAR à S ROS

As células se adaptam ao estresse oxidante induzindo enzimas antioxidantes. Muitas dessas são controladas pelo elemento de resposta antioxidante (ARE), também conhecido como elemento de resposta aos eletrófilos. O regulador central do ARE é o fator de transcrição Nrf2, o qual, ao reagir com um eletrófilo, dissocia do seu inibidor citoplasmático Keap1, move-se para o interior do núcleo e ativa os genes dependentes do ARE. Produtos eletrofílicos da peroxidação de lipídeos, como o hidroxinonenal e a acroleína, são ativadores potentes do ARE por modificação de resíduos tióis reativos da Keap1. Keap1 também reage com carcinógenos eletrofílicos que alquilam o DNA. As enzimas dependentes de ARE são a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e outras enzimas que catalisam a oxidação e a conjugação de carcinógenos e moléculas oxidantes para excretá-los. Uma dessas enzimas, a glutationa S-transferase hepática, catalisa a conjugação com GSH. Os conjugados são então excretados na urina como ácidos mercaptúricos, que são derivados S-substituídos da *N*-acetilcisteína.

A despeito desses múltiplos e potentes sistemas para quelação de metais, ROS são

continuamente formadas no corpo, tanto por enzimas, como por reações espontâneas catalisadas por metais. Nesses casos, existe um grupo de enzimas que agem na desintoxicação das ROS e de seus precursores. Estão aqui incluídas a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx) (Fig. 37.7). A SOD converte $O_2^{\cdot}$ no menos tóxico H_2O_2. Existem duas classes de SOD: uma isozima MnSOD, que é encontrada nas mitocôndrias, e uma isozima CuZnSOD, que está largamente distribuída em toda a célula. Uma isoforma glicoproteica extracelular secretada de CuZnSOD (EC-SOD), que pode ligar-se à s proteoglicanas da parede vascular, é considerada capaz de proteger contra os danos causados por $O_2^{\cdot}$ e $ONOO^-$. A CAT, que inativa o H_2O_2, é largamente encontrada nos peroxissomas, o sítio de maior geração de H_2O_2 dentro da célula.

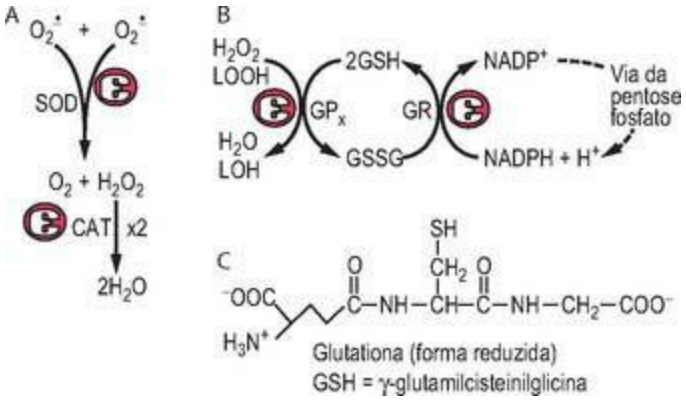


Fig. 37.7 Defesas enzimáticas contra ROS. (A) Superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) são dismutases que catalisam oxidação e redução de moléculas de substratos separados; ambas são altamente específicas para seus substratos, $O_2^{\cdot}$ e H_2O_2, respectivamente. (B) A glutationa peroxidase (GPx) reduz H_2O_2 e peróxidos de lipídeos (LOOH), usando GSH como um cosubstrato. A GSH é reciclada pela glutationa redutase (GR) usando NADPH da via da pentose fosfato. (C) Estrutura da GSH.

A GPx está largamente distribuída no citosol, na mitocôndria e no núcleo. Ela reduz o H_2O_2 à H_2O e os hidroperóxidos de lipídeos a um álcool lipídico, usando glutationa reduzida (GSH) como um cossubstrato. GSH é um tripeptídeo (Cap. 2) que se encontra em concentrações entre 1 e 5 mM em todas as células. A GSH é reciclada por uma enzima NADPH-dependente, a GSH redutase. O NADPH, fornecido pela via da pentose fosfato, mantém uma relação de 100:1 entre a GSH e a GSSG na célula. GPx é uma família de isozimas contendo selênio; uma glutationa peroxidase de hidroperóxidos de fosfolipídeos reduzirá os hidroperóxidos de lipídeos nos fosfolipídeos das lipoproteínas e das membranas, enquanto outras isozimas são específicas para ácidos graxos livres ou hidroperóxidos de ésteres de colesterol. Também existe uma isoforma de GPx nas células epiteliais do intestino, cujo papel considera-se que seja desintoxicar os hidroperóxidos da dieta, por exemplo, dos alimentos fritos.

Três vitaminas antioxidantes, as vitaminas A, C e E, fornecem a terceira linha de defesa contra os danos oxidantes. Essas vitaminas, sobretudo a vitamina C (ascorbato) (Fig. 37.8) na fase aquosa e a vitamina E (α- e γ-tocoferol; Fig. 37.9) na fase lipídica, agem como antioxidantes que interrompem reações em cadeia (Fig. 37.5). Elas agem como agentes redutores, doando um átomo de hidrogênio ($H^{\cdot}$) e extinguindo radicais orgânicos formados por reação das ROS com biomoléculas. Os radicais de vitamina C e E produzidos nessa reação são espécies estáveis quanto à ressonância e não reativos; eles não propagam os danos por radicais e são enzimaticamente reciclados, por exemplo, pela

desidroascorbato redutase (Fig. 37.8). A vitamina C reduz radicais superóxido e peroxil, mas também tem um papel especial na redução e reciclagem da vitamina E. Em resposta ao estresse oxidante grave a vitamina C recicla a vitamina E, de forma que a concentração da vitamina E é mantida constante na fase lipídica até que toda a vitamina C tenha sido consumida (Fig. 37.9). Esses antioxidantes atuam juntos para inibir as reações de peroxidação de lipídeos nas lipoproteínas do plasma e nas membranas. A vitamina A (caroteno; Cap. 11) também é um antioxidante lipofílico. Ainda que melhor compreendida por seu papel na visão, ela é um potente captador do oxigênio singleto e protege a retina e a pele contra os danos da luz do sol.

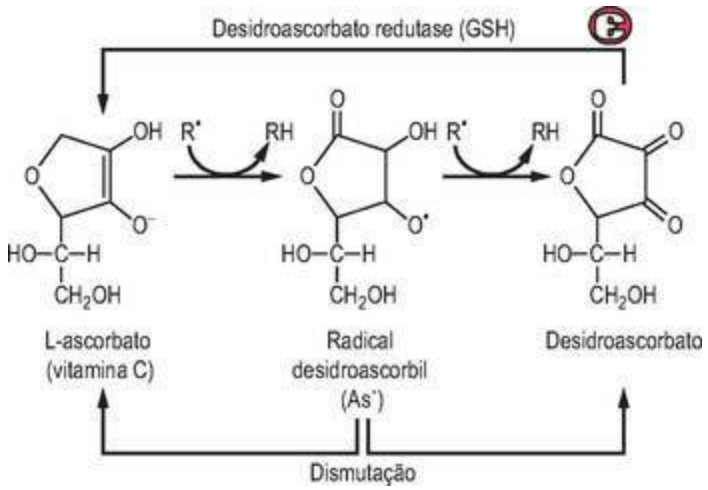


Fig. 37.8 Atividade antioxidante do ascorbato. A vitamina C existe como um ânion enolato em pH fisiológico. O ânion enolato reduz espontaneamente os radicais superóxidos, orgânicos ($R^{\cdot}$) e a vitamina E, formando um radical desidroascorbil ($As^{\cdot}$). O radical desidroascorbil pode dismutar a ascorbato e desidroascorbato. O desidroascorbato é reciclado pela desidroascorbato redutase, uma enzima GSH-dependente presente em todas as células.

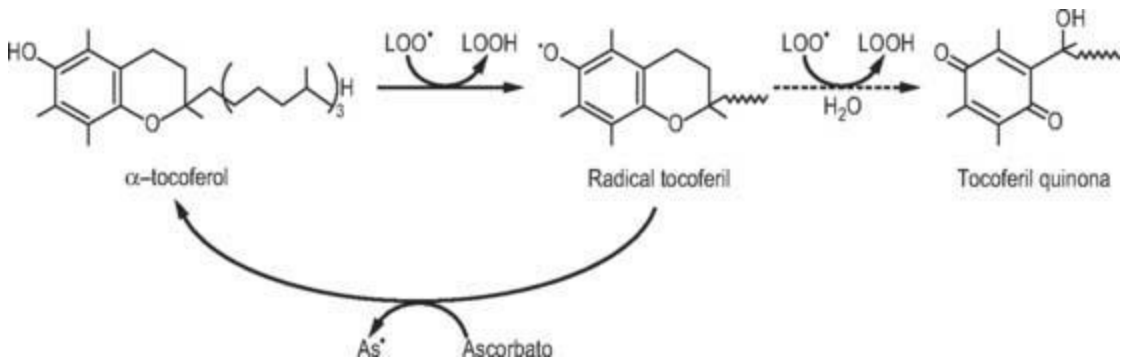


Fig. 37.9 Atividade antioxidante da vitamina E. O termo vitamina E se refere a uma família de isômeros de tocoferol e tocotrienol com atividade de potente antioxidante lipofílico e de estabilização da membrana. Os tocoferóis reduzem radicais hidroperoxil e também inativam o oxigênio singleto. α-Tocoferol é a forma mais efetiva nos seres humanos e a forma principal de vitamina E da dieta. Ele consiste em uma estrutura em anel do cromanol com uma cadeia lateral poli-isoprenoide; as unidades isopreno estão insaturadas no tocotrienol. α, β, γ e δ diferem no padrão dos grupos metil R_1, R_2 e R_3 (Cap. 11). A principal forma comercial da vitamina E é o acetato de α-tocoferol, que é mais estável que o tocoferol livre durante a estocagem. O radical tocoferil, o principal produto formado durante a ação antioxidante da vitamina E, é reciclado pelo ascorbato. A tocoferil quinona também é formada em baixas quantidades.

OS EFEITOS BENÉFICOS DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Embora a maior parte deste capítulo tenha focalizado os aspectos perigosos do oxigênio reativo, vale a pena fechá-lo com algum reconhecimento de que há efeitos benéficos das ROS. Dentre esses estão as funções de regulação do NO, o papel das ROS na ativação das ARE, a necessidade de ROS na atividade bactericida dos macrófagos e o uso de ROS como substratos para enzimas, por exemplo, H_2O_2 para as heme-peroxidases envolvidas na iodinação do hormônio da tireoide. Crescem também as evidências de que ROS, particularmente o H_2O_2, são moléculas de sinalização importantes envolvidas na regulação do metabolismo. Estima-se que a concentração tecidual de H_2O_2 seja na faixa submicromolar; as estimativas variam grandemente, de 1 a 700 nM. Entretanto, mudanças significativas na concentração de H_2O_2 ocorrem em resposta as citocinas, fatores de crescimento e estimulação biomecânica. O fato de que esses eventos de sinalização sejam inibidos por captadores de peróxidos ou por superexpressão da catalase implica o H_2O_2 na cascata de sinalização. O sinal da insulina, por exemplo, parece envolver H_2O_2 como parte de um mecanismo para inativação reversível de algumas tirosina fosfatases de proteínas, ao mesmo tempo que tirosina quinases de proteínas são ativadas pelo receptor de insulina (Cap. 21). À medida que as evidências de que o H_2O_2 tem papel de sinalização tornam-se mais convincentes, aumenta o interesse na pesquisa sobre o papel regulatório do superóxido.

GLUTATIONILAÇÀO DE PROTEÍNA

A S-glutationilação ou a S-glutatiolação das proteínas compreende a formação de uma ligação dissulfeto entre a GSH e um grupo –SH de uma proteína-alvo. A S-tiolação de proteínas é induzida por ROS e por RNS e é vista como tendo o duplo papel de proteger a cisteína contra oxidação irreversível durante o estresse oxidante e de modular o metabolismo celular (regulação redox). As proteínas-alvo são um grande grupo de enzimas regulatórias com grupos –SH no sítio ativo ou no sítio regulatório, como as proteínas quinases e os fatores de transcrição. A S-tiolação também parece proteger as proteínas contra a degradação proteossomal intermediada pela ubiquitina durante o estresse oxidante. Ela é revertida quando ocorre redução não enzimática por GSH ou por enzimas que usam cofatores tióis proteicos (tiorredoxina, glutarredoxina).

ATIVIDADE DA PEROXIDASE PARA DETECÇÃO DE SANGUE OCULTO

As peroxidases, como a glutationa peroxidase (GPx), são enzimas que catalisam o oxidação de um substrato usando H_2O_2. A hemoglobina e o heme têm uma atividade de pseudoperoxidase *in vitro*. No teste para sangue oculto baseado no guáiaco, uma amostra de fezes é aplicada em um pequeno cartão contendo ácido guáiaco. A hemoglobina presente na amostra de fezes oxida os compostos fenólicos no ácido guáiaco a quinonas. Um teste positivo é indicado por uma marcação azul rodeando

o limite da mancha fecal. Hemoglobina e mioglobina parcialmente digeridas de carne animal e algumas peroxidases de plantas podem dar falso positivos. Ensaios similares dependentes de peroxidase são usados para identificar manchas de sangue em cenas de crimes.

O SURTO RESPIRATÓRIO NOS MACRÓFAGOS

Como delineado na Figura 37.11, os macrófagos iniciam uma sequência de reações produtoras de ROS durante o surto de consumo de oxigênio associado à fagocitose. A NADPH oxidase da membrana plasmática do macrófago é ativada para produzir $O_2^{\cdot}$ que então é convertido em H_2O_2 pela superóxido dismutase. O H_2O_2 é usado por outra enzima do macrófago, a mieloperoxidase (MPO), para oxidar o íon cloreto, ubíquo nos fluidos corporais, a ácido hipocloroso (HOCL). O H_2O_2 e o HOCl servem como agentes bactericidas porque atuam na degradação oxidante de lipídeos, proteínas e DNA das bactérias. O macrófago tem uma alta concentração intracelular de antioxidantes, especialmente o ascorbato, para proteger-se durante a produção de ROS.

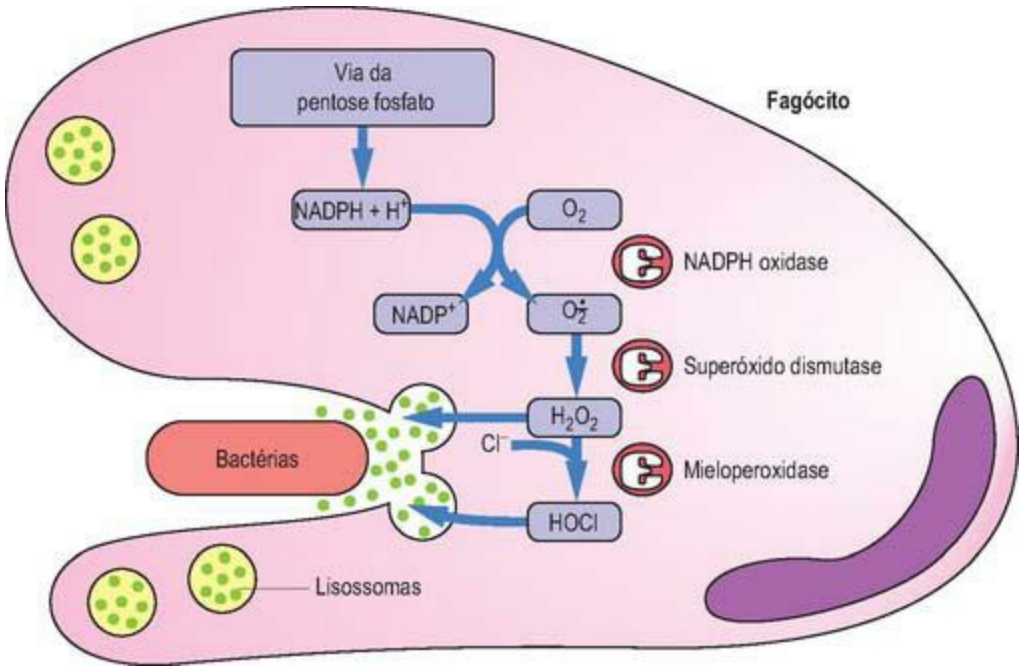


Fig. 37.11 Geração e liberação de ROS durante a fagocitose. Uma cascata de reações que geram ROS é iniciada durante a fagocitose para matar organismos invasores. Enzimas hidrolíticas são liberadas dos lisossomas para ajudar na degradação dos restos microbianos.

O consumo de O_2 pela NADPH oxidase é responsável pelo "surto respiratório", o aumento abrupto do consumo de O_2 para produção de ROS, que se segue à fagocitose. O produto final dessa sequência de reações, o HOCL, é também o oxidante ativo dos alvejantes que contêm cloro. De fato, a infusão intravenosa de soluções diluídas de HOCl foi usada para o tratamento da septicemia bacteriana nos hospitais de campanha durante a Primeira Guerra Mundial, antes do advento da penicilina e outros antibióticos. A doença granulomatosa crônica (CGD) é uma doença herdada que resulta de um defeito genético na NADPH oxidase. A incapacidade de produzir superóxido leva a infecções bacterianas e fúngicas que põem a vida em risco.

A VIA DA GLIOXILASE: UM PAPEL ESPECIAL PARA A GLUTATIONA

Uma fração pequena dos fosfatos de triose produzidos durante o metabolismo se degrada espontaneamente para formar metilglioxal (MGO), um açúcar dicarbonil-reativo. MGO também é formado durante o metabolismo da glicina, da treonina e como um produto de oxidação não enzimática de carboidratos e lipídeos – sendo um precursor importante de produtos finais de glicosilação (AGE) e lipoxidação (ALE) avançadas (Caps. 21 e 44). MGO reage primeiro com resíduos de arginina nas proteínas, mas também com lisina, histidina e cisteína, produzindo inativação de enzimas e ligações cruzadas entre proteínas.

O MGO é inativado por enzimas da via da glioxilase, que é um sistema GSH-dependente encontrado em todas as células do corpo. A via da glioxilase (Fig. 37.10) consiste em duas enzimas que catalisam uma reação redox interna na qual o carbono-1 do MGO é oxidado de um grupo aldeído em um grupo ácido carboxílico e o carbono-2 é reduzido de uma cetona a um álcool secundário. O produto final, D-lactato, não reage com proteínas; o D-lactato é diferente do L-lactato, o produto da glicólise, mas pode ser convertido em L-lactato para metabolismo posterior. Os níveis de MGO e D-lactato estão aumentados no sangue de pacientes diabéticos, porque os níveis de glicose e intermediários da glicólise, incluindo triose fosfatos, estão altos dentro das células no diabetes. O sistema da glioxilase também inativa glioxal e outros açúcares dicarbonil produzidos durante a oxidação não enzimática de carboidratos e lipídeos. Inibidores de glioxilase estão sendo avaliados para quimioterapia porque células cancerosas parecem ser mais sensíveis ao glioxal, talvez por causa da sua dependência aumentada de glicose.

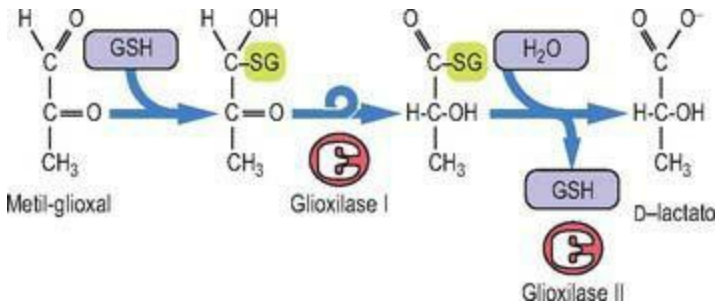


Fig. 37.10 O sistema glioxilase. A glioxilase I catalisa a formação de um aduto tiohemiacetal entre a GSH e o MGO e seu rearranjo a um tioéster. A glioxilase II catalisa a hidrólise do tioéster formando o D-lactato e regenerando a GSH. Diferentemente da GPx, essa via não consome GSH.

DEFESAS ANTIOXIDANTES NOS ERITRÓCITOS

As células vermelhas do sangue (RBC) ou eritrócitos não usam oxigênio para seu metabolismo, nem participam de fagocitose. Entretanto, por causa da alta tensão de O_2 no sangue arterial e do conteúdo de ferro do grupo heme das RBC, as ROS são continuamente formadas nas RBC. Hb produz espontaneamente o superóxido ($O_2^{\cdot}$) em uma reação secundária menor associada à ligação do O_2. A redução ocasional do O_2 em $O_2^{\cdot}$ é acompanhada de oxidação da Hb (ferro) normal em metemoglobina (ferriemoglobina), uma proteína marron-enferrujada que não liga ou transporta O_2. A metemoglobina

pode liberar heme, que reage com $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 em reações tipo Fenton para produzir radical hidroxil ($OH^{\cdot}$) e espécies reativas de oxo-ferro. Essas ROS iniciam reações de peroxidação de lipídeos que podem conduzir à perda da integridade da membrana e à morte celular.

O eritrócito é bem-fortificado com defesas antioxidantes para proteger-se contra o estresse oxidante. Existem atividades de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GPx), bem como de metemoglobina redutase que reduz a metemoglobina de volta em ferroemoglobina normal. Normalmente, menos de 1% da Hb está presente como metemoglobina. Entretanto, pessoas com metemoglobinemia congênita, resultante de deficiência de metemoglobina redutase, têm tipicamente uma aparência cianótica ou escura. O tratamento com grandes doses de ascorbato (vitamina C) é usado para reduzir sua metemoglobina à hemoglobina funcional.

A GSH, em torno de 2 mmol/L nos eritrócitos, não somente sustenta as defesas antioxidantes, mas é também um importante tampão de sulfidrilas, o que mantém grupos –SH na hemoglobina e nas enzimas em estado reduzido. Em circunstâncias normais, quando as proteínas estão expostas ao O_2, seus grupos sulfidrila gradualmente se oxidam para formar dissulfetos intramoleculares ou intermoleculares. A GSH reverte essas reações não enzimaticamente, levando à regeneração dos grupos sulfidrilas (Figs. 12.11 e 12.12).

Resumo

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são as centelhas produzidas pelo metabolismo oxidante. O estresse oxidante pode ser encarado como o preço que pagamos por usar o oxigênio em nosso metabolismo. ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS), como o superóxido, o peróxido, o radical hidroxil e o peroxinitrito são reativos e tóxicos, algumas vezes difíceis de conter, mas sua produção é importante para a regulação do metabolismo, a renovação (*turnover*) de biomoléculas e a proteção contra infecção microbiana. ROS e RNS causam danos oxidantes em todas as classes de biomoléculas: proteínas, lipídeos e DNA. Existem numerosos mecanismos de proteção antioxidante que incluem captação de íons metálicos redox ativos, inativação enzimática das principais ROS, inativação de radicais orgânicos por moléculas pequenas, como a GSH e as vitaminas, e quando tudo o mais falha, reparo e/ou renovação (*turnover*). Biomarcadores de estresse oxidante são prontamente detectados em tecidos sob inflamação e o estresse oxidante tem sido cada vez mais implicado nas patogenias das doenças crônicas relacionadas à idade.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Reveja a evidência de que a aterosclerose é uma doença inflamatória que resulta da superprodução de ROS na parede vascular.

2. Discuta a evidência de que a hiperglicemia no diabetes induz um estado de estresse oxidante que leva a complicações renais e vasculares.

3. Reveja os dados sobre uso de antioxidantes na terapia da aterosclerose e do diabetes. Tomando por base estes estudos, quão forte são as evidências de que essas doenças são resultado de estresse oxidante crescente?

4. Discuta as vantagens recentes do uso de antioxidantes para a proteção de tecidos durante cirurgias e transplantes.

Leituras sugeridas

Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*. 2008;23:381-390.

Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology*. 2008;246:367-371.

Hamilton KL. Antioxidants and cardioprotection. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39:1544-1553.

Mittal A, Phillips AR, Loveday B, Windsor JA. The potential role for xanthine oxidase inhibition in major intra-abdominal surgery. *World J Surg*. 2008;32:288-295.

Romieu I, Castro-Giner F, Kunzli N, Sunyer J. Air pollution, oxidative stress and supplementation: a review. *Eur Respir J*. 2008;31:179-197.

Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 2008;21:172-188.

StoneJr, Yang S. Hydrogen peroxide: signaling messenger. *Antiox Redox Signal*. 2006;8:243-270.

Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS, Ibdah JA, Sowers JR. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294(3):R673-680.

Sites

Antioxidantes Antioxidantes. www.nlm.nih.gov/medlineplus/antioxidants.html.

Antioxidantes e câncer Antioxidantes e câncer. www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/antioxidantsprevention.

Antioxidantes em alimentos Antioxidantes em alimentos. www.ific.org/publications/factsheets/antioxidantfs.cfm.

Vitaminas oxidantes e espécies reativas de oxigênio Vitaminas oxidantes e espécies reativas de oxigênio. http://lpi.oregonstate.edu/f-w97/reactive.html.

Virtual Free Radical School. www.healthcare.uiowa.edu/research/sfrbm/virtual.html.

A Resposta Imune

J.A. Gracie

A. Farrell

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Comparar e diferenciar as respostas imunes inata e adaptativa.
- Caracterizar os elementos celulares e humorais das respostas imunes inata e adaptativa.
- Comparar e diferenciar o reconhecimento de antígenos pelas células das respostas imunes inata e adaptativa.
- Descrever as características-chave da inflamação causadas pela ativação da resposta inata.
- Salientar as funções das citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão.
- Descrever as funções dos subtipos de células T na resposta imune celular adaptativa.
- Descrever a base da diversidade dos anticorpos.
- Definir uma resposta autoimune.

INTRODUÇÃO

O sistema imune, uma coleção de células, tecidos e moléculas, evoluiu para produzir uma resposta coordenada para proteger o hospedeiro das infecções em ocorrência e, além disso, removê-la. A chave para esta habilidade é a distinção entre o que é “próprio” (ao corpo) e o que não é, enquanto mantém-se a homeostase corporal. A imunidade pode ser categorizada entre sendo inata (inespecífica) ou adaptativa (adquirida/específica).

RESPOSTA IMUNE INATA

Quando ativada, a resposta inata é vista como uma resposta inflamatória

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do corpo e protege o organismo do ataque, usando barreiras físico-químicas, como a pele, as mucosas e seus produtos de secreção, como o suor, o muco e seus ácidos. Quando ativada, a resposta inata é usualmente vista como uma resposta inflamatória ou seja, uma resposta corporal à lesão ou dano tissular. Seu objetivo é limitar o dano causado por qualquer agente lesivo e então repará-lo. Ela envolve a interação entre a microvasculatura, as células sanguíneas circulantes, outras células nos tecidos e suas moléculas efetoras. As células que recobrem os vasos sanguíneos, o endotélio, têm um papel importante nos efeitos vasculares, como o aumento da permeabilidade e a vasodilatação. Os efeitos celulares envolvem respostas fagocitárias e secretoras das células que normalmente circulam no sangue e migram para o tecido acometido, assim como células residentes nos tecidos (Tabela 38.1).

Tabela 38.1 Células envolvidas na inflamação.

Células envolvidas na inflamação		
	Circulantes	**Nos tecidos**
	neutrófilo	

Leucócitos polimorfonucleares	eosinófilo basófilo	
		mastócito
Fagócitos mononucleares	monócito	macrófago
Linfócitos		
Plaquetas		
Células Endoteliais		

Os mediadores inflamatórios contribuem para a resposta imune

As células da imunidade inata sintetizam e produzem uma ampla variedade de tipos diferentes de substâncias químicas solúveis, chamadas de mediadores inflamatórios. O fígado também produz certa quantidade destes mediadores, presentes no sangue, incluindo substâncias de fase aguda, como a proteína C reativa (CRP, Cap. 4) e componentes do sistema de complemento.

O sistema complemento

O sistema complemento é ativado por uma série de etapas sequenciais

O sistema complemento consiste em uma série de proteínas circulantes ou ligadas às membranas e tem um papel importante na defesa antimicrobiana do hospedeiro. Existem três vias conhecidas de ativação do complemento. Como parte da resposta inata na ausência de anticorpos, a via alternativa e a via das lectinas ativam o complemento durante a infecção pelo reconhecimento das superfícies microbianas e da ligação às mesmas. Além disso, os anticorpos produzidos em resposta à infecção podem se ligar aos antígenos microbianos e ativar o complemento pela via clássica. A ativação sequencial da cascata por clivagem proteolítica leva a uma resposta amplificadora, produzindo várias moléculas efetoras envolvidas na eliminação da infecção microbiana, como mostrado na Figura 38.1.

- A ativação do primeiro componente leva à liberação da atividade da serino-proteases.

- A ativação do próximo componente na sequência é obtida pela clivagem, do primeiro componente da cascata, em dois fragmentos de tamanhos diferentes.

- A maioria dos fragmentos resultantes da etapa anterior exibe atividade serino-protease e se liga à superfície ativadora, enquanto o fragmento menor tem atividades biológicas específicas, que incluem a facilitação da fagocitose (opsonização), a atração de células (quimiotaxia) e a estimulação da degranulação pelas células imunes (atividade de anafilatoxia).

- Este série de eventos de ativação é repetida com os componentes precursores, criando desta forma um efeito cascata.

- Ativando o próximo componente, o fragmento maior, enzimaticamente ativo, do componente anterior

é inativado.

Em lugar de demonstrar atividade enzimática de ativação, os componentes tardios da via se ligam entre si para formar um complexo que é capaz de romper a integridade da superfície bacteriana pela sua inserção na membrana (ou parede bacteriana) – o complexo de ataque à membrana (MAC).

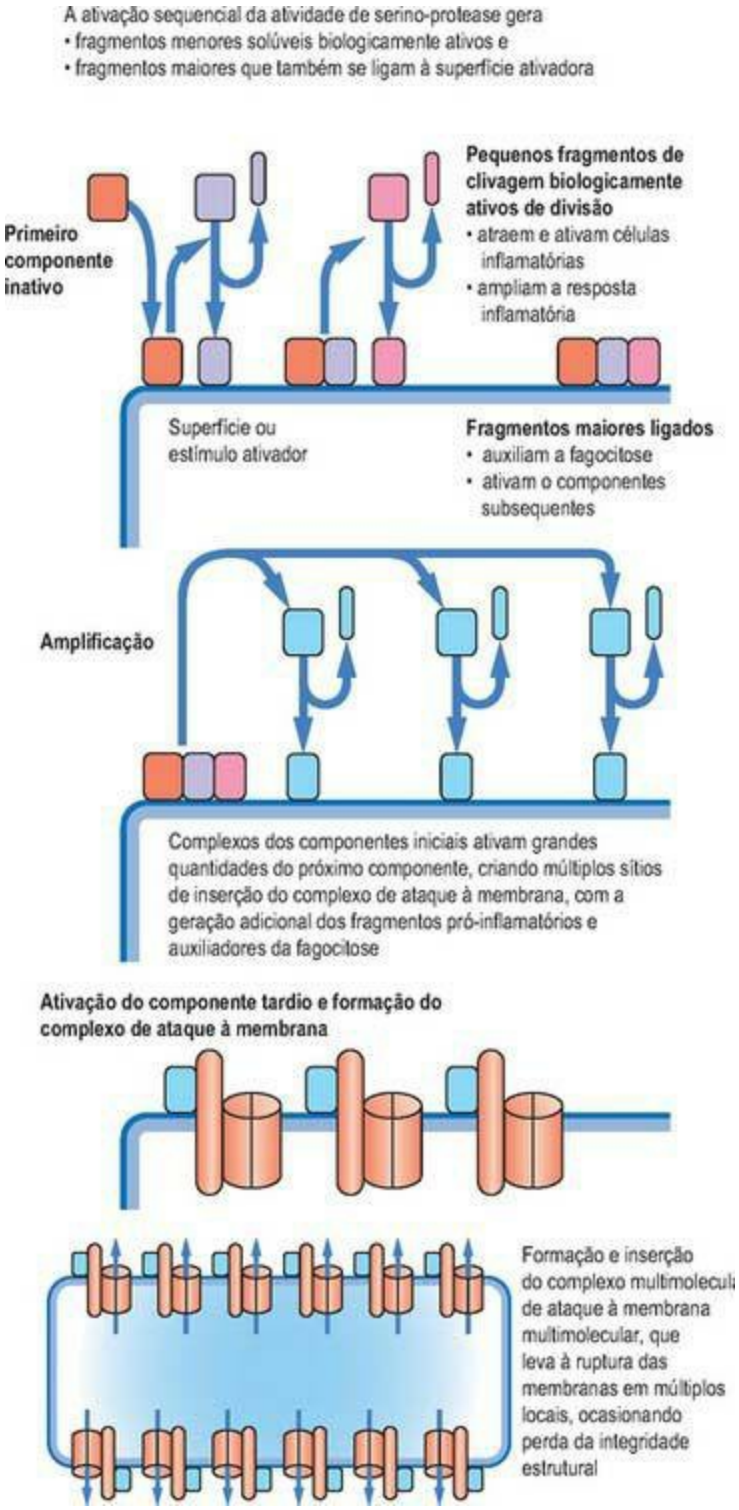


Fig. 38.1 A cascata do complemento. O estímulo ativador se localiza em superfícies que desencadeiam a ativação do complemento à qual o complemento ativado pode se ligar. Os componentes finais da cascata não exibem atividade enzimática. Ao contrário, eles se unem para formar uma macromolécula periférica (o complexo de ataque à membrana), a qual se insere na superfície ativadora (a parede celular, no caso das bactérias), quebra sua integridade e causa lise osmótica.

Citocinas

As citocinas são mediadores solúveis da inflamação e da resposta imune

As citocinas são mediadoras solúveis da inflamação e da resposta imune. Produzidas por uma variedade de tipos celulares, incluindo aquelas das respostas imunes inata e adaptativa, esses peptídeos ou glicoproteínas são ativos em concentrações entre 10^{-9} e 10^{-15} M. Em geral, macrófagos são seus principais produtores durante as respostas inatas e as células T durante a resposta adaptativa. No entanto, muitos tipos celulares podem produzir citocinas. Interagindo com receptores específicos nas superfícies das células-alvo, esse grande número de citocinas atualmente identificado exibe diversos efeitos. A maioria atua localmente em sua região de produção (ação parácrina) ou nas células que as produziram (ação autócrina). Algumas poucas, no entanto, são capazes de agir em células mais distantes dos seus locais de produção (ação endócrina). A rede de citocinas exibe tanto redundância quanto pleiotropia, muitas apresentando efeitos superpostos, e uma capacidade de atuação em numerosos tipos celulares. As citocinas foram agrupadas em subfamílias menores, baseado em suas estruturas e função (ver breve discussão adiante). Os receptores de citocinas não estão restritos às células do sistema imune, sendo encontrados amplamente distribuídos em diversos tipos celulares. Para mais detalhes sobre a sinalização das citocinas, veja o capítulo 40.

As citocinas podem ser classificadas em famílias ou pelo seu efeito principal

- **Fatores estimuladores de formação de colônias:** como o nome sugere, estes estão envolvidos no desenvolvimento e diferenciação de células do sistema de precursores medulares.

- **Interferons (IFNs):** enquanto o IFN-α e o IFN-β têm um papel protetor na replicação viral, o IFN-γ tem um papel significativo na regulação das respostas imunes. Produzido primariamente pelos linfócitos T, o IFN-γ ativa os macrófagos.

- **Interleucinas (ILs):** atualmente há mais de 30 interleucinas reconhecidas, participando na regulação tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Produzidas por vários tipos de células imunes (e outras). Como o nome sugere, um importante meio de ação é a comunicação entre leucócitos.

- **Família do fator de necrose tumoral (TNF):** uma grupo heterogêneo de citocinas, cujos efeitos variam da promoção da inflamação (TNF-α) ao estímulo dos osteoclastos e a reabsorção óssea (osteoprotegerina, OPG).

- **Quimiocinas:** integram uma família de citocinas que promovem a quimiocinese – o movimento em resposta ao estímulo químico. O interesse sobre os receptores destes mediadores se acentuou muito, já que alguns parecem agir como receptores em processos infecciosos, em particular na infecção dos linfócitos pelo HIV.

Previamente era cômodo descrever as citocinas como pró ou anti-inflamatórias. Hoje está claro que tal prática pode gerar confusão, em função de seus efeitos pleiotrópicos e a comparação das respostas inata à adaptativa, e células de origem, talvez deva ser considerada.

- Durante a resposta inata, os macrófagos, as células dendríticas e as células “natural killers” (NK)

são as principais produtoras de: TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8 e muitas quimiocinas, IL-12, IL-15, e IL-18, IFN-γ (células NK). Estas podem ser consideradas como importantes comunicadoras intercelulares, induzindo as respostas imune e inflamatória.

- Se uma resposta adaptativa ou "resposta celular" se desenvolve, as células T, especialmente as células CD4+, se tornam as produtoras principais de citocinas. Seus efeitos geralmente promovem ou controlam respostas adicionais estando incluídas nestas: IL2, IL-4, IL-5, IL-17, IL-10, IL-13 e TGF-β.

Células da resposta inata

Os neutrófilos e os monócitos são normalmente encontrados circulando pela corrente sanguínea e são recrutados para os locais da infecção pelo processo de extravasamento. Pela interação de receptores no fagócito e seus ligantes no endotélio vascular, as células se ligam, se aderem e se movem da circulação para o tecido infectado. Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na corrente sanguínea, com 4.000-10.000/mm^3. Através do recrutamento na medula óssea, este número aumenta rapidamente durante a infecção e usualmente alcança 20.000/mm^3. Os neutrófilos são geralmente as primeiras células a responder à infecção, fagocitando micro-organismos na circulação e se movendo rapidamente para o tecido infectado. Eles têm vida curta (normalmente de algumas horas a poucos dias) e morrem rapidamente após chegarem ao tecido.

Os monócitos se transformam em macrófagos, os "depósitos de lixo da resposta imune"

Os monócitos são encontrados em números muito menores na corrente sanguínea, 500-1.000/mm^3, e em contraste com os neutrófilos, são longevos. Da mesma forma que os neutrófilos, eles também podem migrar para os tecidos, onde se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos têm várias funções-chave, incluindo a fagocitose dos micro-organismos infectantes, a apresentação antigênica e a remoção geral das células hospedeiras mortas ou lesionadas. De fato, os macrófagos são usualmente chamados de "latas de lixo da resposta imune". A maior parte dos órgãos e tecidos conectivos abriga macrófagos residentes, cuja função é vigiar seus ambientes para sinais de infecção.

As células da resposta inata reconhecem os micro-organismos patogênicos por meio de seus receptores

Para montar uma resposta eficiente para a infecção, os neutrófilos e macrófagos devem perceber que o organismo está sob "ataque". Eles o fazem por meio de vários receptores celulares de superfície Os receptores envolvidos no reconhecimento antimicrobiano identificam estruturas que são comuns a diversos micro-organismos e geralmente estão ausentes nas células do hospedeiro. Com frequência as moléculas reconhecidas por estes receptores, chamadas de padrões moleculares associadas aos patógenos (PAMPs), são necessárias ao patógeno para sua sobrevivência ou infectividade e são comuns a famílias particulares de micro-organismos. Destes, o receptor mais bem caracterizado é o sistema "receptor semelhante ao Toll" (TLR) de mamíferos, nomeado em função de um sistema receptor homólogo usado pela mosca Drosophila, da fruta, para proteção contra a infecção. No homem, há pelo menos 12 tipos diferentes de TLR, que podem formar homo- ou heterodímeros com outros membros da família, desta forma aumentando o repertório de reconhecimento antigênico. Os TLR podem ser receptores de membrana ou intracelulares. O TLR4, por exemplo, foi caracterizado como o receptor que reconhece o lipopolissacarídeo (LPS), que é encontrado na superfície das bactérias gram-negativas, como a *E. coli*, mas não é sintetizado pelas células de mamíferos. Outros receptores de reconhecimento padrão incluem os receptores semelhantes ao nod (NLR), mais recentemente descritos, que são proteínas citoplasmáticas que podem regular as respostas inflamatória e de apoptose, pelo reconhecimento de patógenos.

ALERGIA A AMENDOIM: JOVEM HOMEM EM CHOQUE

Um homem jovem foi trazido à emergência em estado de choque com sibilo (ânsia respiratória) e

urticária generalizada. Um acompanhante disse ao médico que o atendeu que o paciente tinha apresentado súbita dificuldade em respirar após comer um lanche. Suspeitou-se de alergia ao amendoim e foi feito o diagnóstico de anafilaxia. A injeção intramuscular de epinefrina foi administrada rapidamente, bem como o tratamento com anti-histamínico intravenoso, corticosteroide e suporte cardiorrespiratório. O paciente se recuperou.

Comentário. Enquanto o efeito fisiológico da resposta da IgE é considerado um protetor contra a infecção parasitária, essa resposta é vista subvertida naqueles que apresentam doenças atópicas (alergia) e anafilaxia. A maior parte da fração da IgE se liga via receptores aos mastócitos tissulares. Quando o antígeno contata e interliga as suas IgE específicas nos mastócitos, desencadeia a desgranulação das células e a liberação de mediadores pré-sintetizados (principalmente histamina). Quando a desgranulação do mastócito é restrita a um local, isso geralmente dá origem apenas a reações localizadas na forma de rinite alérgica ou asma. Se o grau de sensibilização por IgE específica de antígeno e/ou o limiar antigênico é maior, pode ocorrer a desgranulação sistêmica, com um choque anafilático subsequente. Ocorre uma vasodilatação significativa, reduzindo a pressão sanguínea. Isso é acompanhado por grandes aumentos da permeabilidade vascular, levando ao edema subsequente, que afeta em particular a pele e outros tecidos conjuntivos frouxos, como a laringe. O espasmo do músculo liso também ocorre, levando à broncoconstrição com consequente dificuldade respiratória e chiado. Estas características são acompanhadas pelo aumento da atividade produtora das glândulas sero-mucosas dos tratos respiratório e gastrointestinal, assim como urticária da pele.

Receptores de manose e receptores* "scavenger" são *usados por neutrófilos e macrófagos para promover a fagocitose

Outros receptores de superfície usados por neutrófilos e macrófagos para promover a fagocitose e matar os micro-organismos incluem os receptores de manose e os receptores "scavenger" (lixeiros). Os micro-organismos podem ser cobertos por mediadores solúveis da resposta imune, como os componentes do complemente ou anticorpos. Os fagócitos por sua vez expressam vários receptores como os receptores do complemento e receptores Fc, que reconhecem esses componentes do complemento e anticorpos, respectivamente. Esse processo de cobrir as superfícies dos micro-organismos, chamado de opsonização, torna mais eficiente o processo de fagocitose de micro-organismos pelos neutrófilos e macrófagos.

Os receptores usados pela resposta imune inata são codificados por cópia integral de genes e, ao contrário dos receptores usados pelas células da resposta imune adaptativa (discutidas a seguir), não são originados por recombinação somática. Como resultado, a resposta desencadeada por estes receptores é sem memória: isso significa que as células responderão de maneira similar em caso de reinfecção.

RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA

A especificidade da resposta é obtida por meio de receptores que reconhecem os antígenos

A resposta imune adaptativa é necessária quando nossas respostas inatas não têm sucesso, por exemplo, em função da persistência do agente desencadeador. A resposta é iniciada quando os linfócitos reconhecem componentes do agente infeccioso. Os agentes infecciosos são chamados de antígenos e sua ligação com os receptores nos linfócitos desencadeia uma resposta adaptativa. Os receptores nas células B e T são distintos e reconhecem formas antigênicas bem diferentes.

A educação tímica e autotolerância auxilia a distinguir entre o próprio e o não próprio

A diferenciação entre o próprio e o não próprio é crucial para que as respostas adaptativas sejam bem-sucedidas. O sistema imune realiza esta diferenciação por meio dos processos tímicos de educação e autotolerância. Isso assegura que as respostas imunes apropriadas às infecções se desenvolvam. A falha deste processo e a ativação inapropriada da resposta imune por antígenos próprios pode ocasionar o desenvolvimento de autoimunidade, por exemplo, a artrite reumatoide ou o lúpus eritematoso sistêmico.

A resposta imune adaptativa requer tempo para se desenvolver

Quando uma resposta imune adaptativa é iniciada pela primeira vez, parece que relativamente poucos componentes são capazes de reagir especificamente com qualquer substância antigênica contatada. Há um prazo de tempo para que esses componentes aumentem para um nível que possam garantir a eliminação do antígeno, ou pelo menos reduzi-lo ao ponto que seja manipulável pela resposta imunidade inata. Este gasto de tempo, no entanto, pode ser desastroso para o hospedeiro.

A resposta imune adaptativa recorda encontros específicos

A resposta imune adaptativa usa um mecanismo de recordação de um encontro específico, de forma que se a mesma substância exógena ou não própria for encontrada novamente, ela poderá ser eliminada mais efetiva e rapidamente. Isso é conhecido como memória imunológica. Desta forma, em comparação com a imunidade inata, a resposta adaptativa exibe tanto especificidade como memória da substância exógena ou não própria.

As células responsáveis pela resposta adaptativa são os linfócitos

A imunidade adaptativa é mediada, como a resposta inata, por elementos celulares e humorais. As células principais responsáveis são os linfócitos. Existem dois tipos principais de linfócitos circulando no sangue e presentes nos tecidos linfoides:

- Células T, responsáveis por varias respostas celulares.

- Células B, responsáveis pelas respostas humorais, ou seja, produção de anticorpos.

Além dos linfócitos, células apresentadoras profissionais de antígenoss (APC) são necessárias para a ativação eficiente da resposta imune adaptativa.

LINFÓCITOS

A distinção entre as células T e B é facilmente feita fenotipicamente, de acordo com seus receptores antigênicos específicos

As células efetoras basicamente envolvidas na resposta imune adaptativa são os linfócitos T e B. No total, os linfócitos estão presentes no sangue periférico em números variando de 1,5-3,5 × 10^9/L. Destes, aproximadamente 50% a 70% são células T e 10% a 20% células B. Uma terceira população de células "*natural killer*" (NK), assim chamadas pela sua capacidade de matar células neoplásicas sem contato prévio ou sensibilização, são linfócitos atípicos e geralmente considerados parte da resposta inata. A identificação das células T e B é baseada em estudos imunofenotípicos ou funcionais. Estas células possuem marcadores particulares que podem auxiliar na designação de suas linhagens. A distinção entres as células T e B é mais facilmente feita pelos seus receptores antigênicos (Fig. 38.2).

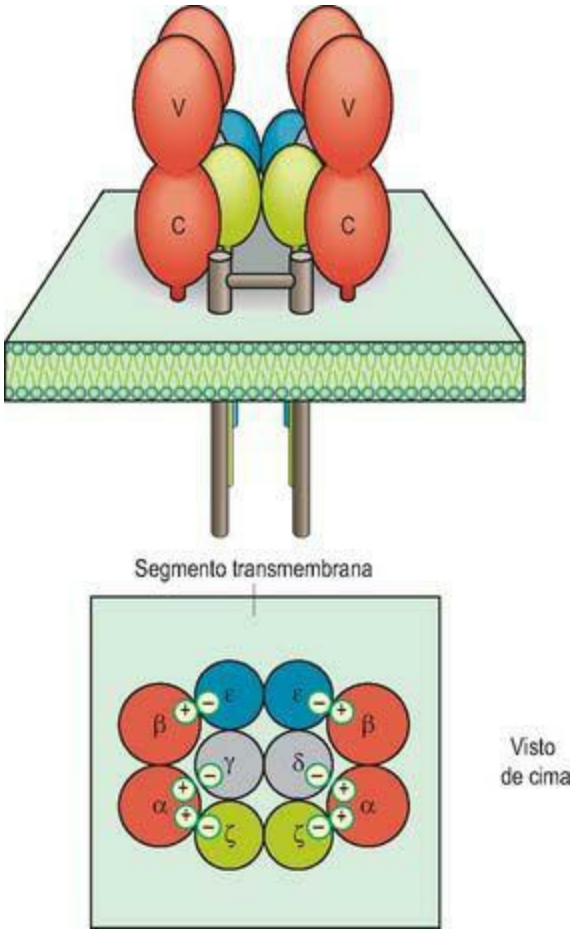


Fig. 38.2 A estrutura do complexo receptor de células T. Esse complexo inclui os receptores de célula T (cadeias α e β), a cadeia σ e o correceptor de células CD3 T contendo δ, γ e duas cadeias ε. As regiões V e C se referem aos domínios constantes e variáveis, respectivamente, de cada uma das cadeias α, β, γ e δ.

Modificado de Male D. et alImmunology, 7th edn. London: Mosby, 2006.

Os linfócitos T e B são ativados pela ligação do antígeno e por moléculas coestimuladoras

O receptor de reconhecimento antigênico nas células B é uma imunoglobulina de superfície (sIg). Ao se ligar com seu antígeno, ela ocasiona a ativação, bem como a proliferação e

diferenciação celulares. Além da sIg, as células B expressam vários outros marcadores, os mais bem-caracterizados entre estes incluem o CD19, CD20 e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II.

O receptor antigênico da célula T (TCR) forma um complexo com o CD3. Outros dois marcadores CD cuja expressão parece exclusiva das células T são os CD4 e o CD8, e eles são úteis na caracterização adicional da função das células T.

As células NK são atualmente identificadas pela combinação da expressão de CD16 e CD56. Esses marcadores são em geral usados na tecnologia de citometria de fluxo, usando anticorpos monoclonais fluorescentes para identificar os tipos celulares.

Outro grupo de moléculas de superfície, chamadas moléculas coestimuladoras, também é encontrado na superfície das células T e B. Após exposição subsequente ao antígeno, o CD28 nas células T se ligará ao CD80/CD86 nas células APC, enquanto o CD40 nas células B se ligará ao CD40L nas células T, acarretando a sua ativação máxima. Sem esta coestimulação, as células T e B não se tornarão suficientemente ativadas após a exposição ao antígeno e podem se tornar anérgicas, isto é, não respondem.

MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO RECONHECIMENTO ANTIGÊNICO

O antígeno é reconhecido por receptores específicos nas células T e B

A capacidade de reconhecer um número enorme de possíveis configurações de antígenos é possibilitada pelas diferenças na sequência de aminoácidos destes receptores, o que acarreta diferenças na forma ou contexto espacial da proteína. O antígeno e seu receptor específico têm uma relação "mão e luva". Tanto os receptores encontrados nas células T e B exibem grande variabilidade na sequência de aminoácidos que entra em contato com o antígeno, enquanto outras partes dessas moléculas são relativamente constantes no que diz respeito as suas sequências de aminoácidos.

EVENTOS NA RECOMBINAÇÃO DE GENES VARIÁVEIS DA IMUNOGLOBULINA

A capacidade de gerar moléculas com sequência variável de aminoácidos, usando um modelo básico sobre o qual alguma variação é superposta, fornece a maneira de gerar tantas formas diferentes quanto há de sequências. Isso é possível pela organização dos genes que dão origem aos receptores antigênicos das células T e B. Ambos passam por rearranjos e recombinações similares para gerar um vasto repertório de unidades de reconhecimento antigênicas. Isso é ilustrado pela representação pictórica da organização de um gene hipotético da cadeia pesada de imunoglobulina.

Um gene de cada segmento de domínio variável se combina com outro gene dos outros segmentos (D e J) para produzir um gene "completo" de domínio variável rearranjado. Este então se associa ao gene que codifica os domínios constantes da cadeia pesada da classe particular em produção. No caso da cadeia leve, apenas dois segmentos estão envolvidos na produção do gene de domínio variável e estes então se associam ao gene que codifica qualquer que seja o tipo de cadeia leve que será produzido. O gene "completo" rearranjado pode ser transcrito e subsequentemente traduzido. Desta forma, múltiplos segmentos gênicos contribuem para a formação de cada gene de domínio variável individual e, em conjunto com a codificação gênica, os domínios constantes completam os genes de cadeia leve e pesada (Fig. 4.6).

Ao contrário dos receptores antigênicos encontrados nas células inatas, os quais são codificados pela linhagem germinativa, os receptores encontrados nos linfócitos T e B são gerados por recombinação aleatória dos genes do receptor durante a maturação celular. Esses receptores de reconhecimento antigênico são distribuídos em clones diferentes. Como resultado, cada clone exibirá uma especificidade exclusiva para um determinado antígeno, desta forma gerando um enorme conjunto de células capazes de responder a todos os antígenos.

Como mencionado, as células T e B diferem naquilo que reconhecem como "exógeno". O receptor antigênico sIg encontrado nas células B é capaz de reconhecer macromoléculas (proteínas, polissacarídeos, lipídeos etc.) enquanto os receptores de célula T reconhecem peptídeos pequenos originados de proteínas previamente processadas pelas APC.

Embora exista um grande número de clones de células T e B, cada um reconhecendo antígenos

diferentes, a consequência da ligação do antígeno apropriado geralmente induz a mesma resposta, isto é, a transdução de sinal. Isso pode levar à ativação celular plena: para as células B ocasiona a produção de anticorpos e para as células T a proliferação e o desencadeamento da resposta imune adaptativa.

O receptor antigênico de células T

O receptor de célula T se assemelha com a porção ligante de uma molécula de imunoglobulina

O TCR é um heterodímero constituído por duas cadeias polipeptídicas diferentes, chamadas de α e β (Fig. 38.2). Além disso, uma pequena população de células T, em particular encontrada sobretudo no intestino, expressa TCR alternativos, com suas cadeias conhecidas como γ e δ. Cada cadeia do TCR é composta por dois domínios – um constante e outro de sequência variável de aminoácidos. O sítio de ligação antigênica do TCR é na fenda formada pelos domínios variáveis N-terminais da cadeia α (Vα) ou β (Vβ). A função efetora do domínio constante em cada receptor antigênico é a transdução de sinal. As duas cadeias se aproximam intimamente por meio das ligações covalentes entre os domínios variáveis e de interações hidrofóbicas não covalentes entre as faces opostas dos domínios constantes. Estruturalmente, o TCR se assemelha à porção de ligação da molécula de imunoglobulina, o receptor antigênico encontrado nas células B.

COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

O MHC é responsável pela maneira como as células T "veem" um antígeno num ambiente de células próprias

Para uma resposta imune ser iniciada, o antígeno não pode simplesmente se ligar à célula T mais próxima, mas deve ser formalmente "apresentado" ao sistema imune. Isso ocorre quando as APC expressam peptídeos antigênicos processados ligados aos sulcos das moléculas de MHC em suas superfícies celulares.

O complexo gênico do MHC é encontrado no braço curto do cromossomo 6 e está agrupado em três regiões conhecidas como classes I, II e III, com os mesmos nomes sendo aplicados aos seus produtos polipeptídicos (Fig. 38.3). As moléculas de classes I e II estão diretamente envolvidas no reconhecimento imune e interações celulares, enquanto as moléculas de classe III estão envolvidas na resposta inflamatória pela codificação de mediadores solúveis, incluindo os componentes do complemento da resposta inata e o TNF.

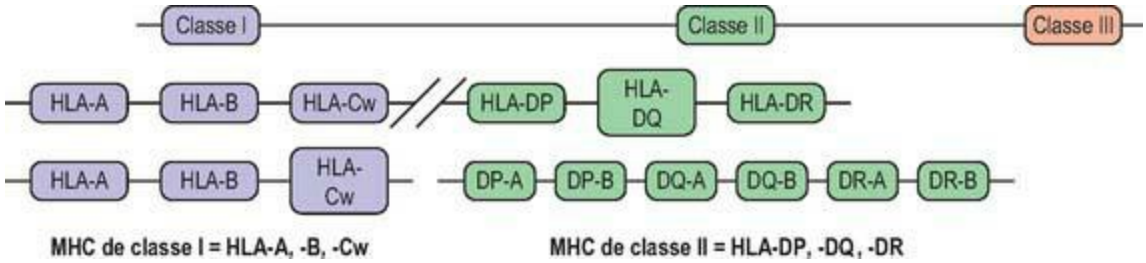


Fig. 38.3 A organização genética do MHC e de seus produtos de expressão. Os genes do MHC em humanos estão localizados no cromossomo 6. Os produtos gênicos são os antígenos leucocitários humanos (HLA).

Os genes do MHC de classe I estão organizados em vários loci gênicos, sendo os mais importantes destes conhecidos como HLA-A, HLA-B e HLA-C

Os alelos do MHC são transmitidos e expressos de forma mendeliana codominante. Em função de sua proximidade no cromossomo, eles são herdados em bloco como partes de um haplótipo e são expressos na superfície de todas as células nucleadas. As cadeias α que eles codificam têm três domínios, um dos quais é semelhante àquele encontrado nas moléculas de imunoglobulina, enquanto os outros dois apresentam diferenças significativas. As cadeias α se combinam com a β2-microglobulina para dar origem a uma molécula funcional de classe I (Fig. 38.4).

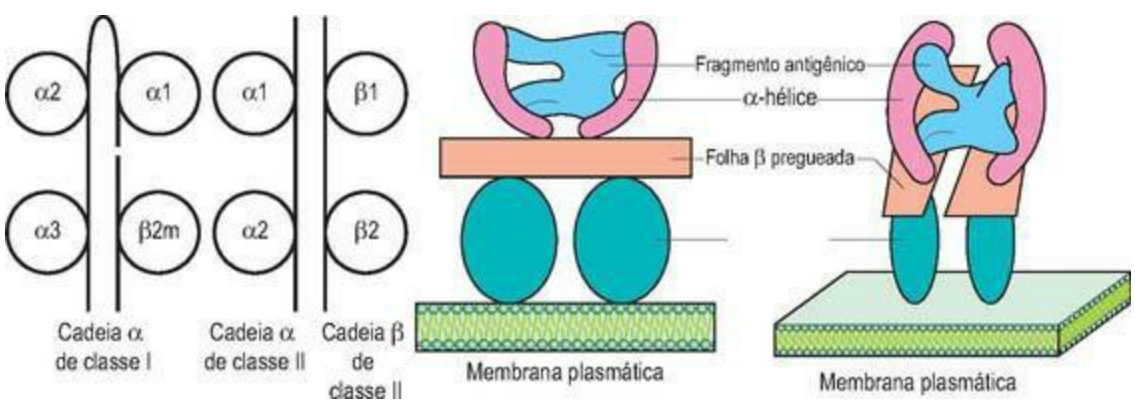


Fig. 38.4 As estruturas dos MHC (HLA) de classes I e II. À esquerda estão as moléculas MHC de classes I e II. Na molécula de classe I, a β2-microglobulina (β2m) fornece o quarto domínio. À direita, a conformação proteica das moléculas de MHC.

Os genes de classe II são HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP

Os genes da sub-região de classe II, conhecidos como HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP são organizados em loci α e β, dando origem às cadeias polipeptídicas α e β, respectivamente. Ambas têm aproximadamente o mesmo peso molecular e se combinam para formar um heterodímero com a estrutura terciária similar à molécula de classe I, com um sulco peptídico no qual o fragmento antigênico processado é inserido durante a apresentação antigênica. Ao contrário da expressão das moléculas de classe I, as moléculas de classe II são mais restritas, sendo expressos principalmente nas APC, como as células dendríticas, assim como nos macrófagos e linfócitos B.

O sistema HLA é amplamente polimórfico

Diversas variantes alélicas (atualmente mais de 1.000) podem ser identificadas em cada um dos loci associados à apresentação antigênica. Existem seis loci principais, cada um possuindo de 10 a 60 alelos funcionais reconhecíveis, e como cada progenitor passa adiante um conjunto ou haplótipo em cada cromossomo, é fácil compreender que a probabilidade de um outro indivíduo da mesma espécie apresente o mesmo conjunto é remota.

O receptor de antígenos das células B

O receptor de célula B (BCR) é a forma de membrana da molécula da imunoglobulina encontrada circulante no soro. As imunoglobulinas são moléculas em forma de "Y" compostas por quatro cadeias polipeptídicas (Cap. 4, Fig. 4.6) – um par de cadeias pesadas, cada uma com peso molecular aproximado de 150 kDa e um par de cadeias leves, cada uma com aproximadamente 23 kDa. Os braços interagem com o antígeno e sua estrutura é baseada nos domínios imunoglobulínicos, com sequências constantes e variáveis e aminoácidos, tanto na cadeia pesada quanto na leve. É o domínio terminal (NH_2) de sequência variável, tanto da cadeia pesada (VH) quanto da leve (VL) que formam uma bolsa que constitui o sítio de ligação antigênica; a porção de ligação dos fragmentos antigênicos (Fab) se localiza no final dos braços (Fig. 4.6). Os domínios restantes de sequência de aminoácidos relativamente constantes das cadeias são chamados de "constante pesado" (CH) e "constante leve" (CL) e formam o tronco (porção Fc), cujas funções incluem a ligação de componentes do complemento, bem como a ligação aos receptores Fc nos leucócitos.

OS TECIDOS LINFOIDES

Tecidos linfoides primários (ou centrais)

Os linfócitos, originários de células tronco hematopoiéticas derivados da medula óssea, são encontrados inicialmente em tecidos linfoides primários, onde sofrem desenvolvimento inicial e diferenciação.

A maturação da maioria das células B ocorre na medula óssea

Inicialmente, as células progenitoras de células B rearranjam seus genes imunoglobulínicos (veja a seguir). Elas o fazem num processo independente de antígenos, pela interação com as células do estroma da medula óssea. A célula B imatura resultante expressa a IgM na superfície como receptor antigênico. Se estas células interagirem de maneira muito firme com antígenos ambientais nesse estágio, são removidas pelo processo de seleção negativa, desta forma limitando a chance de autorreatividade. Em seguida à saída para a periferia, as células B expressarão em sua superfície tanto IgM quanto IgD e podem ser ativadas pela ligação com o antígeno. Essas células proliferarão, algumas se tornando células plasmáticas secretoras de anticorpos, enquanto outras se tornarão células de memória, mais longevas.

Os progenitores dos linfócitos T migram para o timo, onde se diferenciam em linfócitos T

O timo é uma estrutura multilobulada encontrada na linha média do corpo, justo acima do coração. Em nível macroscópico, existe uma área cortical externa e uma área medular interna em cada lóbulo. No timo, o desenvolvimento das células T ocorre à medida que as células T imaturas migram do córtex para a medula. As células T imaturas interagem com o epitélio tímico e com as células dendríticas. Essas células são consideradas responsáveis por processos importantes de seleção positiva e negativa que ocorrem como parte da "educação tímica das células T". Durante este processo as células T são avaliadas no que diz respeito à sua habilidade de interagir com MHC "próprio" e receber sinais de sobrevivência. As células que exibem reatividade excessiva ao próprio recebem sinais que levam a sua deleção enquanto ainda se encontram no timo. Isso remove as células autorreativas, as quais se fossem liberadas para a periferia poderiam potencialmente induzir autoimunidade. O desenvolvimento das células B e T jovens nos tecidos linfoides primários é independente de estimulação antigênica exógena.

Tecidos linfoides secundários

Os tecidos linfoides secundários (periféricos) englobam os linfonodos, o baço e os tecidos linfoides associados às mucosas (MALT)

Estes tecidos são funcionalmente organizados pelo corpo e têm em comum um nível de compartimentalização, com áreas específicas para as células T e B e áreas de intersecção onde estas interagem e respondem ao antígeno. É nestes locais que as reações imunes se desenvolvem de fato. Por exemplo, ao sair do timo, as células T "virgens" recircularão pela corrente sanguínea e entrarão nos linfonodos pelo aumento da expressão das moléculas de adesão apropriadas e receptores de quimiocinas, que permitirão que elas se localizem nas áreas dos linfócitos T do tecido.

No linfonodo, a região da célula T é o paracórtex e a região da célula B são as áreas foliculares da medula. Nesta região, estruturas de dois tipos podem ser encontradas: o folículo primário não estimulado e os folículos secundários estimulados, caracterizados pela presença dos centros germinativos. A linfa que drena dos tecidos para os linfonodos carreará antígenos que serão colhidos pelas APC para apresentação aos linfócitos. Quando ativados, as células T alterarão novamente a expressão dos receptores de quimiocinas e deixarão o linfonodo para recircular no sítio de infecção, onde elas podem induzir uma resposta efetora.

O baço, um órgão abdominal, contém tecido não linfoide (a polpa vermelha), assim como áreas linfoides (polpa branca). Na polpa branca, as áreas foliculares de células B são evidentes e as regiões das células T se localizam entre elas no espaço interfolicular. O baço é usado pela resposta imune para apresentação de antígenos originados no sangue.

Os MALT compreendem os elementos linfoides adjacentes às superfícies mucosas que revestem as superfícies corporais internas

Os MALT são encontrados na entrada do trato respiratório e no intestino, e incluem as amígdalas e adenoides. Mais abaixo no trato digestório, são encontrados agregados não encapsulados de células linfoides, conhecidos como placas de Peyer, superpostos por áreas epiteliais especializadas no escrutínio do ambiente antigênico. De maneira similar aos linfonodos e ao baço, estes tecidos são importantes para seleção e apresentação inicial dos antígenos, em particular dos antígenos que entram no corpo por uma falha do epitélio ou pelo intestino.

CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS

As APC são células especializadas que apresentam antígenos de micro-organismos em sua superfície, para permitir a ativação das células T

As células dendríticas são as principais APC e são encontradas por todo o corpo. A pele e outros órgãos têm suas populações residentes destas células. As células dendríticas podem migrar pelo corpo do tecido para a circulação e durante esta rota podem entrar nos tecidos linfoides secundários especializados, como os linfonodos, onde elas podem ativar linfócitos para a resposta adaptativa. Após captura, as APC podem processar e re-expressar os antígenos, no contexto de MHC, localizados na superfície celular, para a apresentação às células T. As células dendríticas são conhecidas como apresentadoras de antígenos "profissionais", pois além de ser capazes de apresentar os antígenos, também possuem uma quantidade de outras moléculas de superfície, como CD80/86, que podem fornecer sinais adicionais (coestimulação) necessários para os linfócitos T "virgens" para sua completa ativação. Outras células que também são capazes de apresentar antígenos e portanto são consideradas APC incluem macrófagos e linfócitos B.

Moléculas de adesão

As moléculas de adesão medeiam o contato entre as células

As interações celulares diretas que ocorrem durante uma resposta imune são dependentes da expressão de moléculas receptoras e ligantes que medeiam a adesão entre as células ou entre as células e a matriz extracelular. Estas são chamadas de "moléculas de adesão" (Cap. 18). Elas são encontradas numa ampla variedade de tipos celulares, não apenas nas células do sistema imune; por exemplo, no endotélio vascular. O principal determinante de sua expressão é o ambiente predominante de citocinas e a matriz de tecido conjuntivo circundante. Tipicamente, estas moléculas são glicoproteínas transmembrana que transmitem sinais intracelulares e durante a resposta imune estão principalmente envolvidas com as interações célula a célula e com a migração celular. A última função inclui o movimento das células inatas do sangue para os tecidos, durante a infecção, bem como o auxilio a linfócitos para entrar e sair dos linfonodos, enquanto eles circulam pelo corpo buscando sinais de ativação resultantes de apresentação antigênica nos órgãos periféricos. As moléculas de adesão envolvidas na imunidade são agrupadas em três famílias principais:

- **integrinas**, por exemplo o antígeno associado à função do linfócito 1 (LFA-1), molécula de adesão 1 (MAC-1),

- **moléculas de adesão da família do supergene das imunoglobulinas**, por exemplo, a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1, CD54) molécula de adesão plaquetária/celular 1 (PECAM 1, CD31),

- **selectinas**, por exemplo, a L-selectina, P-selectina.

REAÇÃO, RESPOSTA E ELIMINAÇÃO DOS ANTÍGENOS

Ao se ligarem aos antígenos, as células se diferenciam em uma progenie com função efetora ou de memória

Ao se ligarem com sucesso aos antígenos, os linfócitos ativados se submetem a divisões repetitivas ou proliferação. Em seguida há a diferenciação, que pode levar ao desenvolvimento de uma função efetora ou a geração de memória.

A seleção clonal cria clones de células idênticas com uma especificidade antigênica única

O termo seleção clonal é dado ao processo pelo qual a resposta imune cria clones de células idênticas, onde cada clone tem uma só especifidade antigênica exclusiva. Com este repertório clonal, o antígeno determina qual linfócito específico será ativado. O processo de drenagem antigênica e a recirculação linfocitária aos tecidos linfoides periféricos garantem que o antígeno seja inspecionado por vários linfócitos e leve à seleção para proliferação e diferenciação da célula que possui um receptor antigênico específico e recíproco. A seleção clonal (Fig. 38.5) não apenas garante um número adequado de células efetoras para lidar com a ameaça no momento da estimulação inicial, mas também permite que um número conveniente de células de memória "semiativadas" fique a postos para completar sua ativação mais rapidamente na exposição antigênica subsequente.

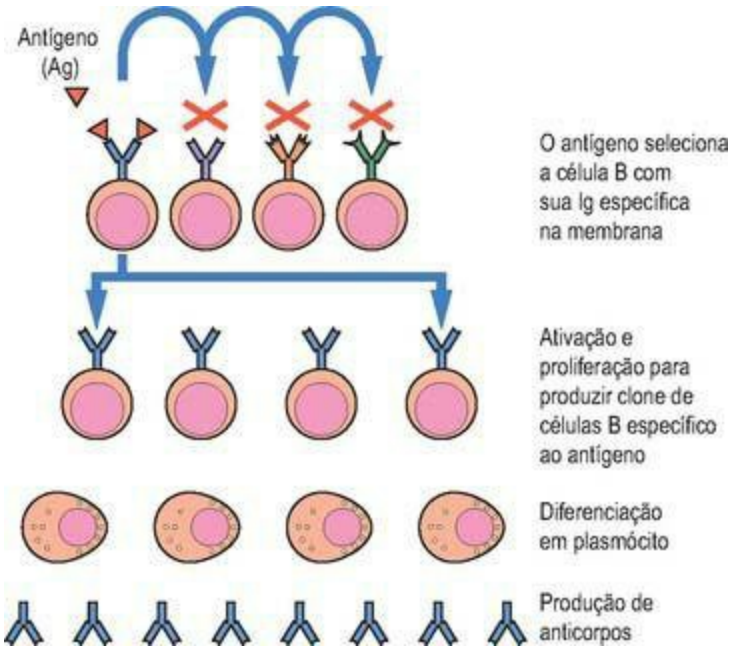


Fig. 38.5 Seleção clonal em células B. A imunoglobulina secretória (sIg) antígeno específica (específica de Ag) na membrana da célula B tem uma conformação recíproca ao antígeno. A ligação do antígeno à imunoglobulina leva à ativação e à proliferação para produzir um clone de células B específicas de antígeno. Cada membro dos clones especificamente ativados se diferencia então em plasmócitos, que produzem grandes quantidades de uma mesma imunoglobulina, com especificidade idêntica àquela sIg que desencadeou a resposta no primeiro momento.

A memória distingue a resposta imune adaptativa da resposta inata

Como a memória imune é gerada ainda é tema de investigação. Na reexposição ao mesmo antígeno, a resposta imune adaptativa, em função da reativação das células de memória duradouras, organiza uma resposta mais rápida e efetiva, comparada com à resposta primária. A proteção

duradoura obtida com a vacinação é resultado da memória imunológica.

Uma resposta imune específica é responsável pela eliminação dos antígenos intracelulares ou integrais à superfície celular

As respostas imunes adaptativas são mediadas por elementos celulares e humorais. Essa resposta tem sido classicamente descrita como tendo "braços" celulares e humorais, onde os linfócitos T são considerados responsáveis pela imunidade celular e as células B responsáveis pela imunidade humoral. Está agora bem-estabelecido que entre seus papéis, a resposta celular ou mediada por células T lida com infecções intracelulares crônicas, medeia as respostas antitumorais, é central no processo de rejeição de tecidos transplantados e guia a hipersensibilidade de contato. As infecções intracelulares crônicas podem ser bacterianas (p. ex., tuberculose), virais, fúngicas ou parasitárias. Além disso, as células T têm papéis centrais no controle das respostas adaptativas pelo auxílio ou regulação de outras respostas, por exemplo, auxiliando as células B a produzirem anticorpos.

A RESPOSTA DAS CÉLULAS T

Existem populações diferentes de linfócitos T. Todas as células T, assim que deixam o timo, expressam CD4 ou CD8 em sua superfície. Essa distinção fenotípica também tem importantes consequências sobre sua função efetora: a células T CD4+ são usualmente conhecidas como "células T auxiliares" (TH), enquanto as células T CD8+ são em geral conhecidas como células T citotóxicas (CTL). As células TH podem ser ainda subdivididas; originalmente elas eram divididas em TH1 e TH2, mas há um recente interesse em um novo subtipo conhecido como TH17 em função da liberação, por estas células, de IL-17. Os subtipos de células T estão esquematizados na Figura 38.6.

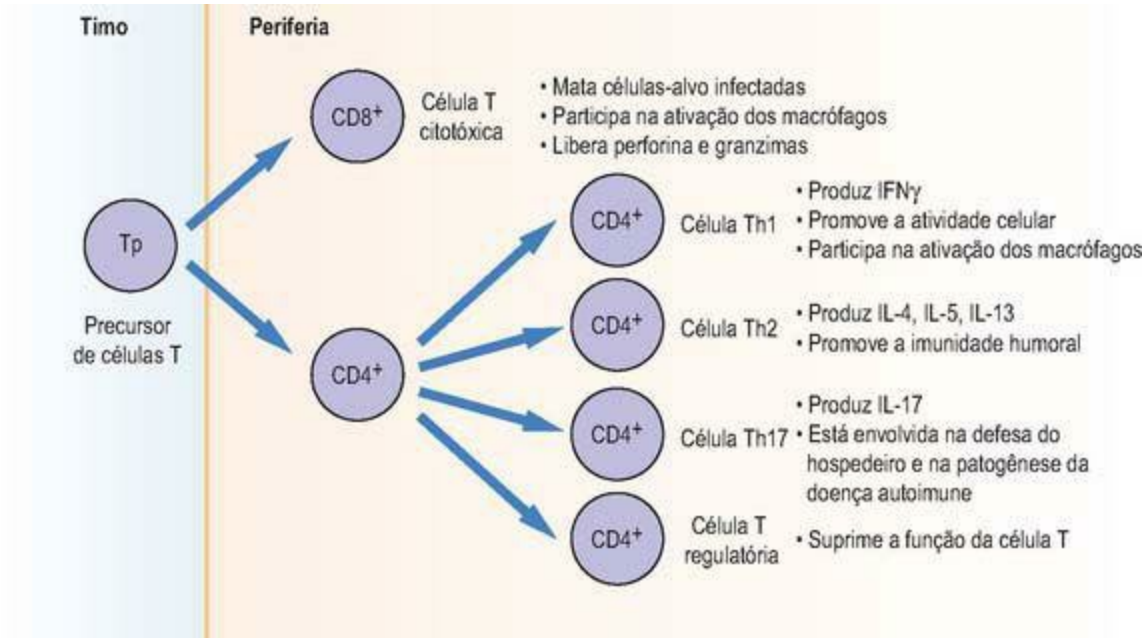


Fig. 38.6 Subtipos funcionais de células T. Os precursores de células T se desenvolvem em células com diferentes funções efetoras.

As células T são responsáveis pela regulação das atividades dos outros ramos do sistema imune. Elas o fazem pelo contato direto célula a célula ou pela secreção de mediadores solúveis que interagem com as células relevantes, sejam outras células T, células B ou células envolvidas na resposta imune inata, como os macrófagos, ou ainda células de outros tecidos.

A classificação das células T depende dos marcadores celulares de superfície

Células T auxiliares: TH1/TH2 e TH17

Essa subpopulação de células T foi inicialmente identificada como "auxiliando" as respostas imunes celulares. Como mencionado, as células T precisam ser apresentadas ao antígeno, no contexto do MHC, na superfície de uma APC. Para as células CD4+, isso é feito por moléculas do MHC de classe II. Essas células T reconhecem os peptídeos antigênicos que foram processados pelas APC e expressos nos sulcos da molécula de MHC. Elas também recebem sinais coestimuladores. A célula T é ativada através da ligação do CD28-CD80/86 e proliferará, gerando células efetoras.

A subdivisão em TH1 e TH2 foi originalmente feita tomando por base suas funções aparentes. As células TH1 aparentavam promover respostas celulares e uma vez ativadas, elas podiam liberar IFN-γ, que por sua vez ampliava a atividade dos macrófagos. Além disso, elas podiam liberar TFN-α, que pela ativação endotelial e subsequente aumento da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, promove o recrutamento adicional de leucócitos e desta forma perpetua a resposta. As células TH2 auxiliam as respostas celulares de uma maneira diferente. Elas aparentam estimular preferencialmente a inflamação mediada por eosinófilos, pela produção de IL-5. Esta é a principal resposta anti-helmíntica. Com a liberação de IL-4 e IL-13, as células TH2 limitam a ativação mediada por TH1 dos macrófagos. Embora todas as células T auxiliares possam influenciar a produção de anticorpos pelas células B, as células TH2, pela liberação de IL-4, podem induzir a troca de suas classes e a produção de uma resposta de IgE. Desta forma, as funções da células "TH" parecem ser determinadas pelo ambiente de citocinas que elas produzem.

Recentemente tem havido bastante interesse em outro subtipo de células TH que não se encaixa no padrão de divisão original TH1/TH2. As chamadas células TH17 foram inicialmente identificadas em modelos animais de diversas doenças autoimunes, incluindo esclerose múltipla, artrite reumatoide e doença do inflamatória do intestino. A compreensão do papel potencial deste subtipo, particularmente na doença humana, é atualmente um importante foco de pesquisa.

Células T reguladoras

Originalmente as células que podem controlar uma resposta mediada por células eram identificadas como "células supressoras". No entanto, a descrição original da célula CD8+ realizando esta função não é considerada válida atualmente. Os tipos celulares estudados neste momento são chamados células T regulatórias, que parecem ser um grupo heterogêneo. A mais estudada é célula T CD4+, que parece ser capaz de controlar a ação de outras células imunes por meio da liberação de uma combinação de mediadores solúveis (IL-10 e TGF-β) e contato célula a célula. Acredita-se que estas células também expressem o fator de transcrição FoxP3, que aparenta ser crucial para o desenvolvimento das células T reguladoras. Como mencionado, o timo tem um papel importante na deleção das células T autorreativas antes que saiam para a periferia pelo mecanismo de tolerância central. Este processo não é 100% eficiente e aceita-se atualmente que as células T regulatórias têm

um papel importante no processo de tolerância periférica, isto é, manter em vigilância as células circulantes que, se permitidas, se tornariam autorreativas e causariam autoimunidade. A transposição deste conhecimento para as aplicações clínicas de prevenção de doenças autoimunes está atualmente está sob investigação. O potencial regulador destas células pode ser também aplicável para induzir tolerância em transplante de órgãos.

INFECÇÃO RECORRENTE EM UMA CRIANÇA IMUNOCOMPROMETIDA

Uma criança de 2 anos de idade apresentava um histórico de infecções recorrentes dos pulmões e por Candida albicans. Os exames revelaram uma quantidade diminuída de neutrófilos, IgG e IgA no sangue. Testes da resposta proliferativa de linfócitos revelaram uma expressão diminuída de CD40 nas células T. Um diagnóstico de síndrome de hiper IgM ligada ao cromossomo X foi feito e o tratamento intravenoso com imunoglobulina iniciado.

Comentário. O auxílio de células T é requerido para as respostas efetivas de células B. Interações especiais são necessárias para a mudança de isotipo de resposta IgM, que é típica de uma resposta primária de anticorpos, para isotipos IgG e/ou IgA, mais maduros, observados nas respostas secundárias de anticorpos, produzidas por exposições subsequentes ao antígeno. O CD40L nas células T é necessário para interagir com o CD40 em células B e permitir isso. Na sua ausência, a produção de anticorpos é limitada à IgM e o indivíduo afetado fica imunocomprometido, devido à falta de outros isotipos importantes, críticos para a integridade da resposta imune. A ocorrência de infecção mais associada a problemas nas respostas celulares sugere que um defeito nas células T traz consequências funcionais para este braço da resposta imune.

Além de restringir a chegada, os MHC de classes I e II fornecem um mecanismo diferencial para o processamento de antígenos que se originam dentro das células, por exemplo, vírus, e aqueles que se originam do ambiente extracelular, por exemplo, os antígenos bacterianos. As classes diferentes de MHC também levam estes antígenos a interagir com o sistema imune por vias diferentes, particularmente com as células T, de maneira que cada classe lidará melhor com um sistema efetor diferente: os MHC de classe I levam a respostas citotóxicas dos linfócitos T CD8+, enquanto os MHC de classe II instruem os linfócitos T CD4+ a fornecer a ajuda necessária às células B para uma resposta mediada por anticorpos.

Células T citotóxicas (CTL) matam células infectadas

A outra população importante das células T, baseada em sua expressão superficial de CD8, é conhecida como células T citotóxicas. Seu papel é principalmente matar células infectadas (p. ex., por vírus). As células T CD8+ reconhecem peptídeos antigênicos associados ao MHC classe I na superfície da célula infectada. Fazendo isto, elas são capazes de limitar a infecção. Ao reconhecer o antígeno, a CTL se tornará ativada sem a necessidade de coestimulação. Ela se ligará fortemente à célula infectada, usando moléculas de adesão e o principal método para matar as células infectadas é pela liberação de proteínas como as granzimas e perforinas. O resultado desta liberação destas enzimas na célula infectada é a ativação da apoptose guiada por caspases (Cap. 43). As células apoptóticas são removidas pelas células fagocíticas inatas, como os macrófagos.

A RESPOSTA IMUNE HUMORAL ESPECÍFICA

A resposta imune humoral é caracterizada pela liberação de anticorpos pelos plasmócitos (linfócitos B maduros)

A imunidade humoral, ou mediada por anticorpos, é dirigida para a infecção extracelular, especialmente por bactérias e seus produtos, bem como para a fase extracelular das infecções virais e transplantes celulares ou de órgãos alogêneicos. A resposta imune humoral é caracterizada pela liberação de anticorpos pelos plasmócitos, linfócitos B completamente maduros. Considerando que os anticorpos reconhecem muitos tipos de moléculas, incluindo polissacarídeos e lipídeos, essa resposta é particularmente eficiente contra patógenos extracelulares. Ao se ligarem aos componentes estruturais de superfície dos micro-organismos, os anticorpos bloqueiam a adesão destas bactérias ou vírus e impedem os efeitos danosos de suas toxinas, num processo chamado neutralização. No entanto, a simples ligação do anticorpo, na maioria das situações, não garantirá a eliminação do antígeno. Para obter esta resposta, o fragmento não ligante de antígeno da molécula de anticorpo (porção Fc) é capaz de ativar outros componentes da imunidade inata, por exemplo, pela ativação do sistema complemento. A diversidade de funções efetoras é obtida por recombinações gênicas dos genes da cadeia pesada, além daquelas presentes, para gerar diversidade e especificidade ao componente de ligação ao antígeno. Desta forma, a especificidade antigênica original é preservada, enquanto as funções efetoras podem ser alteradas.

Os subtipos de células B regem a resposta imune humoral

De maneira similar à resposta celular, mediada por vários subtipos de células T, a resposta humoral também utiliza subtipos diferentes de células B. Como mencionado, as células T, particularmente as TH, interagem com as células B direta e indiretamente por receptores de membrana e citocinas, respectivamente. Isso ocorre num nível tão importante que as respostas efetivas das células B são consideradas dependentes das células T. As células B denominadas B-2 são encontradas nos folículos dos órgãos linfoides secundários. Elas respondem tipicamente a antígenos proteicos e produzem anticorpos de alta afinidade e realizam troca de classe de Ig, típica das respostas humorais. Na zona marginal do baço, há outra população de células B que respondem caracteristicamente aos antígenos polissacarídicos provenientes da circulação. Outra população, conhecida como B-1, que expressa receptores similares e CD5 na superfície de sua membrana, é encontrada em mucosas e no peritônio. Distintamente das células B foliculares clássicas, as células B-1 da zona marginal produzem predominantemente uma resposta de IgM, tipicamente contra antígenos não proteicos.

Os anticorpos ilustram a capacidade do sistema imune para gerar diversidade

Para as respostas dependentes de células T, a reexposição ao antígeno induzirá uma resposta de anticorpos secundária. Os maiores níveis de anticorpos produzidos terão afinidade e avidez aumentada para aquele antígeno em particular, em função de processos de troca de classe de cadeia pesada e maturação de afinidade. O sistema imune humano normal é capaz de produzir uma quantidade ilimitada de anticorpos altamente específicos, com a capacidade de reconhecer qualquer e todos os elementos "não próprios" com os quais ele venha a ter contato. A falha no controle da resposta imune efetiva pode resultar na produção de anticorpos contra antígenos próprios, conhecidos como "autoanticorpos", e estes são característicos de várias doenças autoimunes, incluindo o lúpus eritematoso sistêmico (SLE), artrite reumatoide (AR) etc.

Os termos anticorpo, gama globulina e imunoglobulina são sinônimos

Cinco classes de imunoglobulinas são reconhecidas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, com subclasses reconhecidas para IgG (IgG 1, 2, 3 e 4) e para IgA (1 e 2). Quando estudadas em nível molecular individual, nenhuma outra proteína exibe tanta variação de sequência de aminoácidos entre membros individuais da mesma classe ou subclasse. Isso é ainda mais evidente nos domínios NH2-terminais de ambas as cadeias leve e pesada, que são responsáveis pela região de reconhecimento antigênico da molécula. Os anticorpos são capazes de discriminar entre moléculas que caracterizam a cápsula de cobertura externa de espécies bacterianas diferentes, que podem variar em apenas um aminoácido ou um resíduo de monossacarídeo. Isto é consequência das dimensões da área reconhecida pela molécula de anticorpo, sendo de 10 a 20 Å (10^{-10}m) e, desta forma, significativamente influenciada pela alteração da conformação tridimensional ocasionada pela mudança de um simples resíduo de aminoácido.

Os anticorpos são bons exemplos de como a função é intimamente relacionada com a estrutura

Os anticorpos (imunoglobulinas) são moléculas em forma de "Y" (Fig. 4.6). Os braços interagem com o antígeno e o tronco fornece funcionalidade efetora adicional. Essa função secundária ou efetora dota o anticorpo da capacidade de iniciar uma resposta imune que ajuda a eliminá-lo.

A ativação do sistema complemento é uma das funções mais importantes dos anticorpos

A ativação do sistema complemento (Fig. 38.1) é uma das funções efetoras mais importantes dos anticorpos na resposta imune adaptativa. Isso é conseguido com o uso de um conjunto de componentes conhecidos como "via de ativação clássica", que engloba C1q, C1r, C1s, C4 e C2. A ativação sequencial destes componentes leva à ativação do componente C-3, crítico e central para a ativação completa do sistema complemento. Uma vez que a última é obtida, o complexo terminal de ataque à membrana, que envolve os componentes C5, C6, C7, C8 e C9, é ativado. Este complexo por fim gera uma estrutura polimérica em forma de anel, que se insere nas membranas celulares bacterianas e é responsável pela lise celular. Essa via clássica é desencadeada pelo do C1q se ligando à IgG ou à IgM que já esteja ligada ao seu antígeno específico (Fig. 38.7).

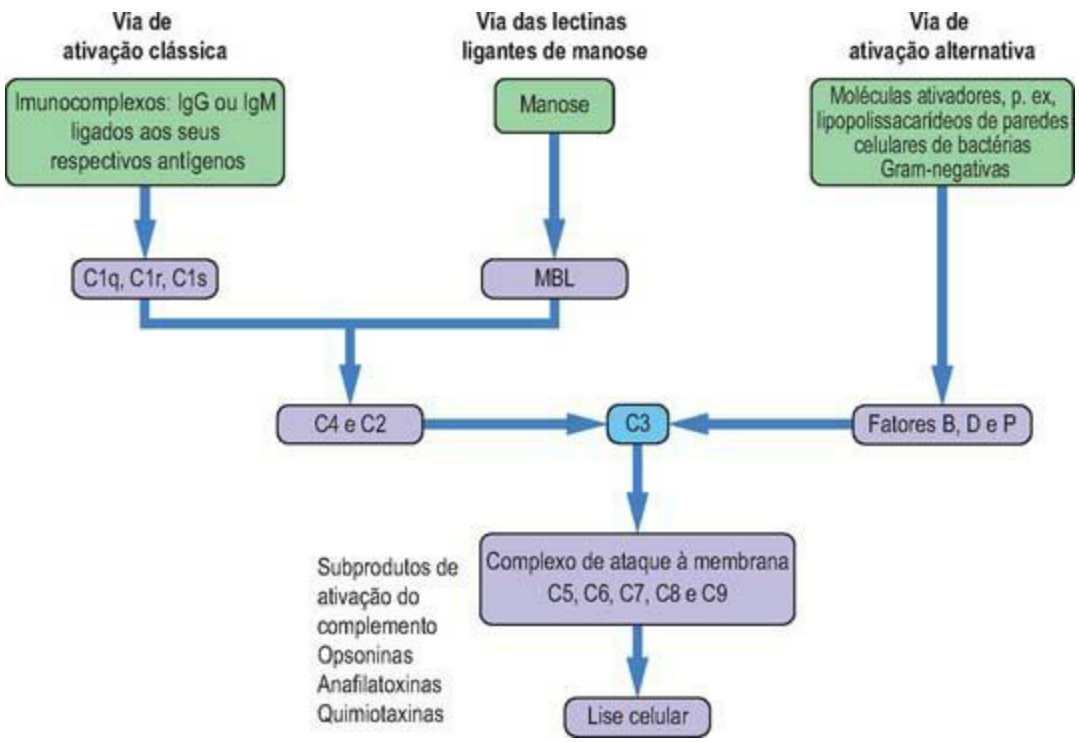


Fig. 38.7 Vias de ativação do complemento. Existem três vias possíveis para a ativação do complemento. Apenas a via clássica é desencadeada pela resposta imune específica via anticorpos. A "via ligantes de manose" (MBL) e a via de ativação alternativa são desencadeadas diretamente por micro-organismos e seus produtos, independente de anticorpo. (Compare com a Figura 38.1.)

Existem outras duas vias de ativação, ambas constituindo partes da resposta imune não específica; elas provavelmente são mais antigas na evolução. Estas são as vias alternativas, que podem ser ativadas por lipopolissacarídeos, como aqueles encontradas nas paredes bacterianas das bactérias gram-negativas, e a via "ligante de manose" (MBL, que pode ser ativada por manose e outros carboidratos em particular, encontrados nas paredes celulares de fungos, bactérias, vírus. As funções efetoras dos anticorpos estão resumidas na Tabela 38.2.

Tabela 38.2 As funções efetoras dos anticorpos.

As funções efetoras dos anticorpos		
Tipos	**Funções**	**Concentração no sangue periférico**
IgG	neutralização	6,0–16,0 g/L
	opsonização para os neutrófilos e macrófagos	
	imunidade passiva para o feto, pela passagem transplacentária	
	ativação do complemento pela via clássica	
	citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos	
	“natural killer” - morte de células ligadas aos anticorpos mediada pelos FcRs (receptores da porção Fc)	
	principal isotipo usado na resposta secundária de anticorpos	
IgA	defesa das superficies mucosas como a imunoglobulina predominante produzida pelas MALT, neutralização	0,8-4,0 g/L
IgM	neutralização	0,5-2,0 g/L
	ativador mais efetivo da via clássica do complemento	
	isotipo predominante nas respostas primárias por anticorpos	
IgD	possível papel na transdução de sinais e na maturação das células B	0,03 g/L

	o significado da IgD drculante é indefinido	
IgE	papel principal na defesa das superficies mucosas contra micro-organismos multicelulares	<120kU/L

VACINAÇÃO

Provavelmente a aplicação mais simples e benéfica desenvolvida para fortalecer o sistema imune tenha sido a vacinação. O processo de vacinação ilustra bem as interações entre os braços humoral e celular da resposta imune adaptativa e as propriedades que a caracterizam melhor – especificidade e memória. No primeiro encontro, o sistema imune e o antígeno interagem para selecionar linfócitos com receptores específicos para aquele antígeno. Estes sofrem ativação, proliferação e diferenciação em células efetoras de memória, um processo que pode levar até 14 dias para se completar (Fig. 38.8). No entanto, o processo de geração de células de memória deixa uma população de células semiativadas para aquele antígeno específico. Na reexposição subsequente ao antígeno, a resposta será mais rápida em função do estado de semiativação das células de memória e mais efetiva em função do grau de maturação da resposta, devido à diferenciação dos linfócitos que já havia sido iniciada.

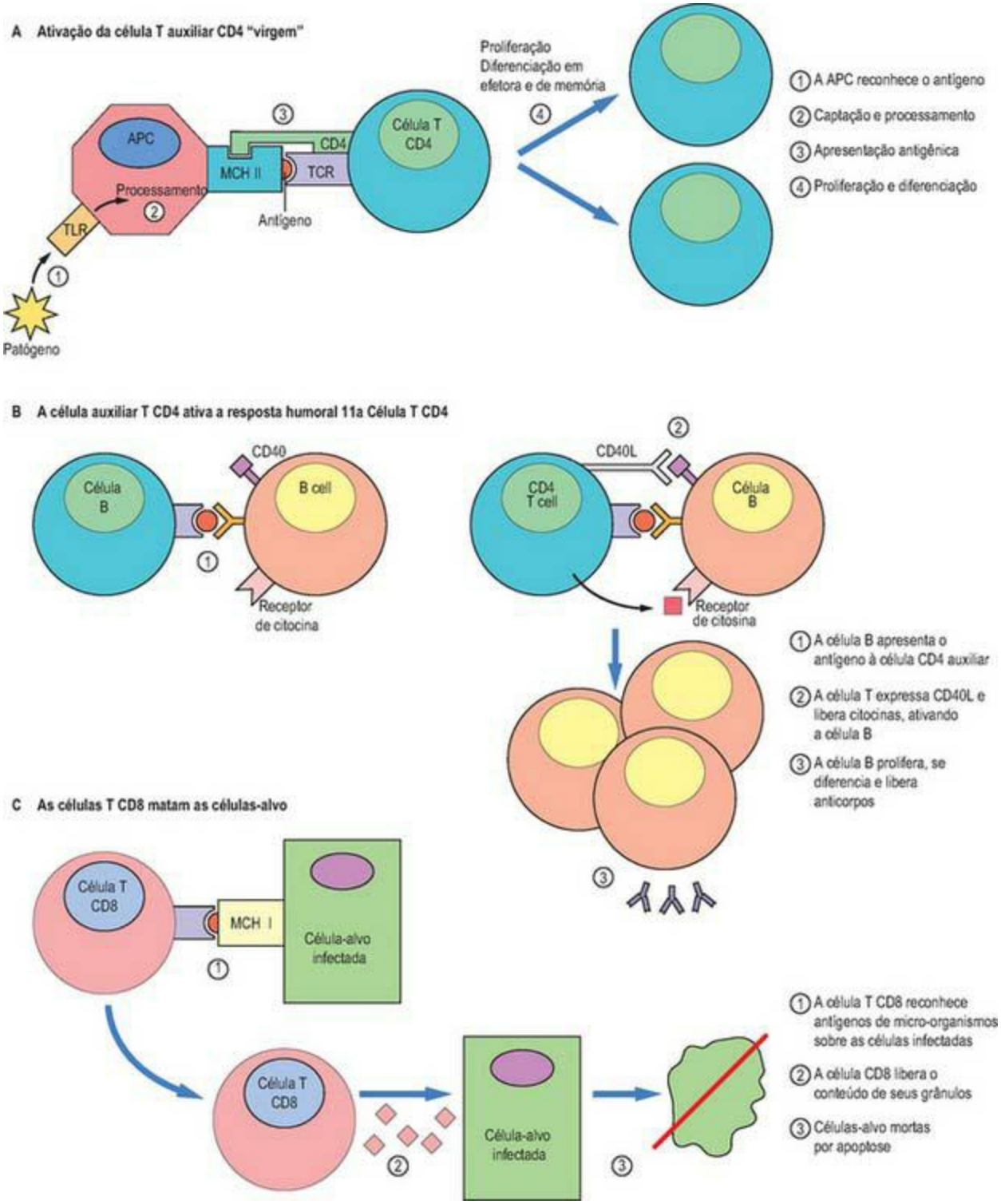


Fig. 38.8 Resumo da resposta imune adaptativa. Inter-relações entre os componentes celular e humoral da resposta imune específica. As APC ativam as células T CD4 "virgens", que por sua podem ativar as células B. As células T citotóxicas matam as células-alvo infectadas.

Em relação às respostas por anticorpos, o primeiro contato com o antígeno desencadeia uma resposta predominante de IgM. No contato subsequente, os linfócitos sofrem maturação, diferenciação adicional, troca de classe de anticorpos e produzem mais rápido uma resposta predominantemente de IgG. Isso fornece funções efetoras adicionais àquelas obtidas apenas com IgM. Esta resposta mais robusta e específica que reduz tanto a gravidade quanto a duração do dano causado pelo antígeno agressor.

A autoimunidade é normalmente evitada pela educação tímica: uma falha nos processos envolvidos pode levar à doença autoimune

Embora as funções do sistema imune sejam em sua maioria benéficas, há diversas situações onde elas podem causar efeitos deletérios. Estas situações são consideradas como aberrações da qualidade, quantidade ou direcionamento da resposta.

Um aspecto particular desses distúrbios, o da autoimunidade (autorreatividade), é evitado pelos processos de tolerância central (durante a educação tímica) e dos processos de tolerância periférica, que incluem deleção clonal e anergia. Os clones autorreativos são eliminados ou tornados impotentes, ou por depleção tímica ou por serem sendo controlados por células T regulatórias na periferia. Estes mecanismos podem ser vistos como uma estratégia à prova de falhas em múltiplos níveis. Se estes processos falharem ou forem contornados, o estado resultante de autorreatividade e o dano inflamatório constituem a doença autoimune.

A forma da doença é determinada pelo antígeno-alvo e pela forma de resposta imune. Em suas formas mais simples, reações contra antígenos ubíquos levam ao que é conhecido como doenças autoimunes não específicas de órgão, enquanto reações a componentes únicos de tecidos individuais, órgãos ou sistemas levam à doenças específicas de órgão. O primeiro tipo é mais bem-exemplificado pelo lúpus eritematoso sistêmico (SLE), onde os antígenos-alvo aparentes são componentes comuns a todos os núcleos. Danos são vistos em vários tecidos, incluindo a pele, articulações, rins e sistema nervoso. Estas doenças e as outras mencionadas na Tabela 38.3 são o foco da disciplina imunologia clínica e imunopatologia. Mais informações podem ser encontradas nos livros citados nas “Leituras sugeridas” a seguir.

Tabela 38.3 Falhas do sistema imune.

Falha do sistema imune	
Autoimunidade	a resposta inadequada aos antígenos próprios pela quebra da autotolerância pode levar a condições autoimunes.
	Exemplos: artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes melito tipo 1.
	a reação inapropriada ou exagerada a um patógeno ou

Hipersensibilidade	antígeno pode usualmente acarretar urna resposta que lesa mais o corpo que a próprio agente causador.
	Exemplos: febre do feno em resposta ao pólen, resposta anafilática aos alimentos (p. ex., amendoim).
Imunodeficiência	respostas imunes ineficazes à infecção podem causar imunodeficiências. Podem ser usualmente hereditárias ou induzidas por infecção ou tratamento medicamentoso.
	A imunodeficiência primária é um defeito intrínseco de um ou mais componentes da resposta imune, p. ex., produção de antícorpos ou função fagocítica diminuída.
	Exemplos: agamaglobulinemia ligada ao X, que apresenta níveis muito baixos de células B e imunoglobulina sérica.
	Imunodeficiência grave combinada (SCID), na qual o timo não se desenvolve e não há célulasT presentes.
	Imunodeficiência secundária pode ocorrer após infecções, porexemplo, a AIDS, onde o vírus infecta as células T CD4, ou em resposta a certas drogas, como os esteroides que podem prejudicar a função imune.

Resumo

A resposta imune integrada aos elementos [antígeno(s)] próprios alterados ou não próprios é estabelecida por vários componentes. Alguns destes exibem uma especificidade a um antígeno estimulador em particular e constituem a resposta imune adaptativa, ou específica, enquanto outros reconhecem padrões patogênicos gerais e constituem a resposta imune inata, ou não específica.

A resposta inata representa a primeira linha de resposta e está presente em todos os eucariotos. As células e os mediadores solúveis envolvidos são principalmente aqueles associados aos processos de inflamação e ativação vascular.

A resposta adaptativa é mais refinada e geralmente invocada apenas em função da falha ou da estimulação continuada da resposta inespecífica. As células responsáveis pela resposta imune adaptativa são os linfócitos T e B. A especificidade que eles exibem para o antígeno incitante é obtida via receptores antigênicos específicos, expressos em sua superfície celular.

As células T reconhecem o antígeno processado via seus receptores, interagindo com o mesmo apresentado pelas células portadoras de MHC, levando à secreção de citocinas adicionais e à geração de funções efetoras como a de célula T auxiliar e a de citotoxicidade, exercidas pelas células T auxiliares e T citotóxicas, respectivamente. Historicamente, as respostas das células T foram chamadas de resposta imune celular. Um subtipo diferente de células T CD4+ é conhecido como regulador, uma vez que controla as respostas adaptativas e em parte previne a autorreatividade da resposta imune.

As células B reconhecem antígenos exógenos e produzem proteínas chamadas de anticorpos que se ligam diretamente ao antígeno. Historicamente, as células B e seus produtos, os anticorpos, foram chamados de resposta imune humoral.

Tanto as células B como as células T, bem como os seus produtos, são capazes de recrutar e utilizar componentes da resposta inata de uma maneira mais específica e direcionada, com o objetivo de eliminar ou erradicar o antígeno.

Além de demonstrar especificidade, a resposta imune adaptativa também demonstra outra característica importantíssima que não é vista na resposta inata – a memória de seu encontro com um antígeno. O benefício é que no contato subsequente com o mesmo antígeno, uma resposta reforçada e mais eficiente levará à remoção do agente causador mais rapidamente, com menos dano tissular do que na ocasião anterior.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Compare as funções dos linfócitos T e B.

2. O que são moléculas de adesão e qual o papel delas na resposta imune?

3. Quais são as características-chave das respostas imunes inata e adaptativa?

4. Qual é o papel do fragmento Fc de uma imunoglobulina?

5. Qual é o papel do timo da resposta imune?

Leituras sugeridas

Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology, 3rd edn. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008.

Chapel H, Heaney M, Misbah S, Snowden N. Essentials of clinical immunology, 5th edn. Oxford: Blackwell, 2006.

D'Cruz D, Khamashta M, Hughes GRV. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 2007;369:587-596.

Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt IM. Immunology, 7th edn. London: Mosby, 2007.

Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular patter recognition receptors in the host response. *Nature*. 2006;442:38-44.

Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway's immunobiology, 7th edn. London: Garland, 2005.

Nature Insight. Autoimmunity. *Nature*. 2005;435:583-627.

Endocrinologia Bioquímica

R.K. Semple, F.F. Bolander, Jr.

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Entender os princípios que governam a sinalização endócrina e sua regulação.
- Descrever a anatomia básica, a organização e o papel regulador do hipotálamo e da pituitária.
- Descrever os processos reguladores que controlam a biossíntese, o transporte e o mecanismo de ação dos hormônios tireoidianos.
- Descrever os mecanismos que regulam a síntese e a ação dos glicocorticoides.
- Resumir os mecanismos que regulam a síntese e a atividade dos hormônios esteroides sexuais e seus papeis na regulação da reprodução humana.
- Descrever as ações diretas e indiretas do hormônio do crescimento, incluindo o papel do IGF-I.
- Resumir o papel da prolactina na reprodução.
- Descrever as consequências das deficiências e dos excessos dos hormônios regulados pelo eixo hipotálamo-pituitária.

INTRODUÇÃO

Como uma primeira abordagem, o corpo humano contém 10 trilhões – ou 10 milhões de milhões – de células, as quais podem estar a mais de dois metros de distância uma da outra. A coordenação e a regulação do crescimento e das múltiplas funções dessas células, de modo a suprir as demandas da existência em condições ambientais constantemente flutuantes, requerem sistemas integrados precisos e altamente sofisticados. O sistema nervoso é uma parte-chave da resposta, sendo particularmente bem adaptado para mediar reflexos e ações motoras necessários, por exemplo, em situações de luta ou fuga, as quais podem requerer respostas em frações de segundo. O sistema endócrino, no entanto, é o principal meio de regulação de uma ampla faixa de funções menos agudas, incluindo crescimento, desenvolvimento, reprodução, muitos aspectos da homeostase e a resposta a estímulos externos e estresses mais crônicos. Essas respostas endócrinas ocorrem durante vários segundos em sua forma mais rápida e por dias ou semanas em sua forma mais lenta. Falhas nesses sistemas de controle endócrino altamente elaborados, complexos e frequentemente interconectados são comuns e levam a várias doenças muito prevalentes.

HORMÔNIOS

O conceito de que os órgãos e tecidos podem produzir “secreções internas” que influenciam o comportamento de partes distantes do corpo provavelmente surgiu pela primeira vez na França no século XVIII, e no início do século XX a adrenalina e a vasopressina (ADH) foram isoladas. No entanto, foi somente em 1905, logo após o isolamento da secretina, que Ernest Starling, em Londres, usou pela primeira vez a palavra “hormônio” para descrever esses mensageiros internos. Sabe-se agora que os hormônios são substâncias químicas que são produzidas por glândulas especializadas ou grupos de células e que induzem respostas específicas em células e órgãos distantes. Classicamente, tais hormônios provêm do sangue e são descritos como hormônios *endócrinos*. No entanto, subsequentemente ficou claro que alguns hormônios atuam localmente em células ao redor de sua célula de origem – conhecidos como hormônios *parácrinos* – ou mesmo na própria célula que os produziu – conhecidos como hormônios *autócrinos*.

Tipos de hormônios

Os hormônios possuem estruturas químicas variadas

Muitos tipos diferentes de moléculas funcionam como hormônios (Tabela 39.1). No nível mais simples, aminoácidos modificados, tal como a epinefrina (adrenalina), têm atividade hormonal, e muitas dessas aminas simples também atuam como neurotransmissores (Cap. 42). Outros hormônios são polipeptídeos que variam em tamanho desde tripeptídeos (p. ex., hormônios liberadores de tireotropina) até glicoproteínas complexas (p. ex., hormônio luteinizante, LH). Os menores hormônios peptídicos são sintetizados como grandes peptídeos ou pró-hormônios proteicos, que são clivados por enzimas proteolíticas para liberar o hormônio ativo da glândula endócrina. Outros hormônios se originam da modificação de lipídios simples, tal como colesterol ou ácidos graxos.

Tabela 39.1 A derivação química dos hormônios.

Derivação química dos hormônios	
Derivados de aminoácidos	
Derivative de aminoácidos	catecolaminas, serotonina, tiroxina

Tripeptídios	TRH
Pequenos peptídios	AVP (ADH), somatostatina
Peptídios de tamanho intermediário	insulina, hormônio paratireoidiano
Polipeptídíos complexos e	gonadotropinas.TSH
glicoproteínas	
Derivados de precursores lipldícos	
Derivativos de colesterol	cortisol, testosterona, estradiol
	vitamina D
Derivativos de ácidos graxos	prostaglandinas, leucotrienos
Derivativos de fosfolipídios	fator de ativação de plaquetas
Derivados de outros químicos	
Purinas	adenosina
Gases	óxido nítrico

AVP/ADH, arginina vasopressina ou hormônio antidiurético; TRH, hormônio liberador de tireotropina; TSH, hormônio tireoestimulante.

Muitas glândulas e tecidos produzem hormônios

Os hormônios são mais conhecidos por serem secretados por glândulas sem ducto, tal como a tireoide, as adrenais e a pituitária, as quais já são conhecidas pelos anatomistas há séculos. Contudo, muitos hormônios são tão potentes que precisam circular apenas em concentrações plasmáticas diminutas para exercer efeitos biológicos significativos e podem se originar de pequenos grupos de células ou a partir de um tipo celular em particular espalhado em um grande órgão. Além do mais, está ficando claro agora que muitos tecidos que não eram tradicionalmente conhecidos por serem ativos em termos endócrinos na verdade secretam ampla variedade de diferentes hormônios com efeitos diversos em outros tecidos. De fato, a disponibilidade da sequência genômica humana, aliada à bioinformática e a técnicas mais sofisticadas, como o perfil transcricional baseado em microarranjos (Cap. 36), levou à descoberta de muitos novos hormônios e receptores hormonais suspeitos, e o entendimento dos mecanismos endócrinos que regulam a fisiologia humana provavelmente aumentará rapidamente. Apesar disso, neste capítulo a ênfase está nos sistemas hormonais muito bem estabelecidos que são o foco da endocrinologia clínica atual.

ÓRGÃOS ENDÓCRINOS NÃO CLÁSSICOS

Muitos tecidos distantes das clássicas glândulas endócrinas sem ducto são agora conhecidos por serem ativos endocrinologicamente; os sinais produzidos medeiam um “diálogo” metabólico importante entre diferentes tecidos. Exemplos disso incluem a produção de leptina a partir do tecido

adiposo branco, o que sinaliza para o cérebro o armazenamento de energia (Cap. 22), a produção do fator de crescimento dos fibroblastos 23 (FGF23) a partir dos ossos, o que modula o manuseio do fosfato renal e é ectopicamente produzido por alguns tumores, levando a uma perda clinicamente importante de fosfato renal e à osteomalácia, e a produção de fatores de saciedade como a grelina a partir do intestino delgado. A placenta também é um tecido endócrino altamente ativo: além de produzir βHCG, progesterona, hormônio do crescimento placentário e lactogênio placentário humano, os quais têm papéis bem conhecidos na gravidez, ela produz muitos outros hormônios em altos níveis cujos papéis ainda estão por ser determinados.

PRINCÍPIOS DA AÇÃO HORMONAL

De modo a funcionar efetivamente levando sinais de uma parte do corpo para outras, os sistemas endócrinos devem exibir certas propriedades gerais (Fig. 39.1).

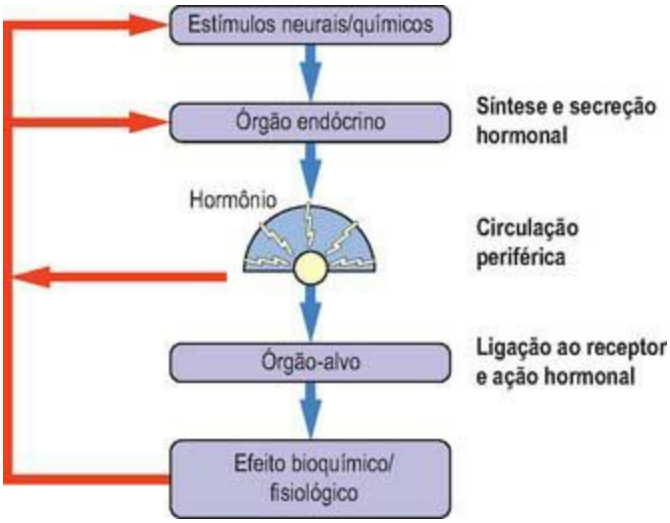


Fig. 39.1 Processos endócrinos básicos. A regulação retroativa da ação hormonal é um exemplo clássico de autorregulação.

Acoplamento da liberação hormonal aos estímulos relevantes

Alguns hormônios funcionam para transmitir para o corpo informações ambientais importantes, enquanto outros estão mais relacionados com a calibração de processos metabólicos envolvidos na manutenção da homeostase. Em ambas as situações é essencial que haja uma tradução efetiva da magnitude do estímulo na quantidade de hormônio liberado. Como isso é alcançado varia, dependendo do estímulo. Mecanismos simples de sensibilidade homeostática incluem, por exemplo, o acoplamento direto da liberação do hormônio paratireoidiano aos níveis de cálcio através de receptores de superfície celular que se ligam ao cálcio (Cap. 25) e o acoplamento direto da secreção de insulina aos níveis plasmáticos de glicose através da sensibilidade das células β pancreáticas à concentração de glicose sanguínea (Cap. 21). Muitos dos sistemas endócrinos descritos neste capítulo, ao contrário, são controlados por neurônios modificados que secretam hormônios na corrente sanguínea. O nível de secreção de tais neurônios é frequentemente determinado por complexos sinais de entrada sinápticos de várias partes diferentes do cérebro, assim como pela sensibilidade aos metabólitos circulantes e hormônios. Esses neurônios secretórios funcionam, portanto, como sítios importantes de integração de uma variedade de informações ambientais, psicológicas e fisiológicas.

Retroalimentação

A principal característica da maioria dos sistemas endócrinos é a retroalimentação negativa. Isso significa que a resposta induzida pela ação de um hormônio retroalimenta a inibição do nível de sua produção. O efeito disso é a atenuação das flutuações no processo controlado pelo hormônio, acentuando assim a estabilidade desse processo e, consequentemente, da homeostase. Contudo, se as retroalimentações negativas fossem o único processo em jogo, consequentemente a resposta do sistema permaneceria constante. De fato, muitos sistemas endócrinos, principalmente os controlados pelo hipotálamo, apresentam um ritmo distinto. Isso é determinado pelo produto líquido dos sinais de entrada neurais para os neurônios secretórios relevantes, e, nessa situação, a retroalimentação negativa serve alternativamente para suavizar as alterações do perfil hormonal e prevenir instabilidades de curta duração. Além disso, a modulação da suscetibilidade dos neurônios controladores à inibição retroativa representa um mecanismo potencial de modulação do nível de resposta do sistema endócrino.

A retroalimentação positiva se refere a um maior estímulo da produção ou liberação hormonal pela resposta que ele provoca. Essa alça de alimentação por "empuxo" é inerentemente instável e leva a um aumento rápido e exponencial no nível do sinal. Ela é muito mais rara do que a retroalimentação negativa na fisiologia, mas desempenha um papel importante em alguns processos que requerem um ajuste de tempo preciso, tal como o pico de aumento de hormônio luteinizante que precede a ovulação.

Transdução de sinais nos tecidos-alvo

Os hormônios atuam pela ligação a receptores específicos, tanto na superfície celular quanto dentro da célula-alvo (Cap. 40). Classicamente, há um alto grau de especificidade nessa ligação e é essa interação hormônio-receptor que dispara e coordena uma ampla faixa de efeitos biológicos. Os receptores hormonais podem ser divididos em diferentes famílias de acordo com suas estruturas, e cada família compartilha amplamente mecanismos de transdução de sinais (Cap. 40). Muitos hormônios semelhantes a aminas e peptídeos que não podem atravessar a bicamada lipídica atuam através de receptores acoplados à proteína G, enquanto alguns peptídeos maiores, como a insulina e o IGF-I, atuam através de receptores com atividade de tirosina quinase. Ambos os tipos de receptores são proteínas intrínsecas da membrana plasmática, e cada um deles conta com cascatas de eventos fosforilativos sequenciais para alterar a atividade enzimática e a expressão gênica. Os hormônios esteroides, alguns hormônios derivados de ácidos graxos e a tri-iodotironina, que têm propriedades físico-químicas em comum com os esteroides (Cap. 17), entram nas células antes de se ligarem a seus receptores. Estes, conhecidos como receptores hormonais nucleares, são efetivamente fatores de transcrição ativados por ligantes e fornecem uma ligação muito direta entre a exposição de uma célula a um ligante hormonal e a alteração de padrões de expressão gênica (Cap. 34). Muitos receptores potenciais de hormônios desconhecidos têm sido identificados em virtude da homologia de sequência entre membros de cada uma das principais classes de receptores hormonais. É provável que a identificação do ligante para esses receptores "órfãos" amplie significativamente a lista de hormônios endócrinos.

O *IMPRINTING* NA ENDOCRINOLOGIA

A expressão gênica pode ser influenciada não somente pela sequência de DNA dos genes e suas regiões promotoras, mas também por modificações covalentes do DNA, tal como a metilação de resíduos de citosina (*imprinting*, impressão), que ocorre particularmente em regiões promotoras e atua para silenciar genes. O estado da metilação de alguns promotores depende de qual progenitor o gene foi herdado e, como os padrões de metilação são preservados quando as células se dividem, os principais efeitos do "progenitore de origem" podem ser vistos, mais nitidamente, quando há uma mutação em um alelo parental. Diversos sistemas endócrinos apresentam um *imprinting* significativo. O mais conhecido é o sistema receptor IGF-II-IGF-II, que atua influenciando o crescimento placentário e fetal. Outro importante gene de sinalização endócrina que sofre *imprinting* é o gene GNAS, codificando uma subunidade da proteína G estimulatória, acoplada a muitos receptores endócrinos clássicos de hormônios peptídicos. Várias mutações diferentes têm sido descritas e, dependendo de qual progenitor elas foram herdadas, podem produzir displasia esquelética e resistência a vários hormônios, incluindo mais frequentemente o hormônio paratireoidiano. De fato, o conhecido "pseudo-hipoparatireoidismo" foi o primeiro exemplo relatado de resistência de um órgão-alvo a um hormônio. Para uma revisão da biologia fascinante e complexa do GNAS, os leitores devem procurar Weistein LS *et al*. Minireview: GNAS: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004; **145**:5459-5464. (Compare com a pág. 342 e a Tabela 40.2.)

Desligando o sinal

Os níveis dos hormônios são sinais fisiológicos úteis somente se também houver uma via efetiva de desativação dos seus sinais. A inativação hormonal geralmente ocorre por metabolismo adicional (p. ex., proteólise, hidroxilação e conjugação), seguido de excreção dos seus metabólitos. Tal degradação pode ocorrer no plasma, em órgãos como o fígado e em tecidos-alvo após a internalização do hormônio mediada pelo receptor. A taxa de eliminação dos diferentes hormônios varia enormemente, desde poucos minutos (insulina) até horas (esteroides) ou mesmo dias (tiroxina). A medida das concentrações urinárias dos hormônios ou de seus metabólitos pode ser usada em alguns testes para diagnóstico, incluindo os de confirmação de gravidez, e de patologias como tumores adrenais.

Muitos sistemas endócrinos têm características adicionais comuns.

Proteínas carreadoras e hormônios “livres”

Na circulação, muitos hormônios pequenos ou hidrofóbicos são transportados ligados a proteínas carreadoras. Por exemplo, a tiroxina e o cortisol são transportados em globulinas ligantes específicas do plasma, tal como a globulina ligante de hormônios da tireoide (TBG) e as globulinas de ligação a corticoides (CBG). Isso tem diversas consequências de relevância, tanto para as medidas fisiológicas quanto clínicas. As proteínas transportadoras estendem a meia-vida biológica e aumentam a concentração plasmática dos hormônios menores, os quais, de outro modo, seriam rapidamente eliminados no fígado ou rins. Isso também significa que pode haver grandes diferenças entre os níveis plasmáticos totais do hormônio e do hormônio não ligado ou “livre” em solução, o qual é geralmente a forma biologicamente ativa. Logo, a interpretação clínica dos níveis hormonais plasmáticos é mais simples se os ensaios são desenvolvidos para detectar somente o hormônio livre, senão devem ser feitas suposições sobre os níveis de proteínas ligantes, o que por sua vez pode ser significativamente influenciado pelas condições nutricional e hormonal. Não são apenas os hormônios lipofílicos pequenos que têm proteínas plasmáticas de ligação; tanto o hormônio do crescimento quanto o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 têm proteínas plasmáticas de ligação que influenciam a biodisponibilidade e a atividade tecidual dos hormônios de várias maneiras diferentes (Tabela 39.2).

Tabela 39.2 Exemplos das principais proteínas ligantes de hormônios.

Hormônio	Proteína ligante	% aproximada de ligação	Observações
Tiroxina	globulina ligante dos hormônios tireoidianos (TBG)	75%	aumento clinicamente significativo na gravidez inicial
	albumina	10-15%	
	transtiretina	10-15%	
Testosterona	globulina de ligação de hormônios sexuais (SHBG)	60-70%	os níveis de SHBG são fortemente regulados hormonalmente (p. ex., suprimidos pela insulina e aumentados pelos hormônios tireoidianos)
Cortisol	CBG	75%	as variações de suas proteínas ligantes podem ser enganosas, assim como é o caso da dosagem do cortisol total geralmente medido. Logo, mulheres que tomam estrogênios (aumento do CBG) podem ter o cortisol total alto, mas o cortisol livre normal, enquanto em doenças graves ou desnutrição ocorre o contrário
	albumina	15-20%	
GH	GHBP	50%	a GHBP é um fragmento solúvel do receptor GH. Essa é uma característica comum de muitos hormônios semelhantes a citocinas
IGF-IV	IGFBP-III	75%	há 6 IGFBPs que modulam a atividade parácrina do IGF-I e podem ter papéis de sinalização por si próprias

Metabolismo local dos hormônios nos tecidos-alvo

Outra característica de alguns sistemas endócrinos, particularmente aqueles que envolvem os hormônios esteroides, é o metabolismo local dos hormônios e pró-hormônios próximos a seus respectivos receptores. Isso pode envolver a conversão de um hormônio circulante ativo para uma forma mais potente (p. ex., testosterona para di-idrotestosterona pela 5α-redutase nos folículos capilares dependentes de androgênios e na glândula prostática) ou a criação de um hormônio ativo a partir daquele que é efetivamente um pró-hormônio circulante (p. ex., tiroxina para tri-iodotironina pela deiodinase ou a síntese do estradiol a partir de androgênios adrenais no tecido adiposo). Um mecanismo similar também é empregado para evitar que os receptores de mineralocorticoides no rim sejam expostos a altas concentrações de cortisol, com o cortisol sendo inativado pela 11β-hidroxi-esteroide desidrogenase tipo II, que é altamente expressa próximo aos receptores de mineralocorticoides. Muitos outros exemplos dessa interconversão intracelular dos hormônios esteroides têm surgido, e o estudo desse fenômeno tem sido algumas vezes apelidado de "intracrinologia" (Tabela 39.3).

Tabela 39.3 Exemplos do metabolismo hormonal nos tecidos-alvo.

Hormônio	Enzima	Substrato	Efeito do produto na atividade
T4	deiodinase tipo 2	T3	gera um potente T3 a partir do T4 quase inativo nos tecidos-alvo
Testosterona	aromatase	estrogênio	além de desempenhar um papel importante no ovário gerando estrogênio, a aromatase é expressa em outros tecidos, incluindo osso, tecido adiposo e hipotálamo. Mesmo nos homens, essa conversão local de androgênio em estrogênio é importante na mediação dos efeitos da testosterona na densidade óssea e na retroalimentação negativa central na produção de LH/FSH
Testosterona	5α-redutase	di-hidrotestosterona	produz um ligante mais potente para o receptor de androgênio, amplificando a atividade da testosterona localmente: a deficiência genética produz pseudo-hermafroditismo
Cortisol	1β-hidroxisteroide desidrogenase tipo II	cortisona	converte o cortisol, o que ativa o receptor de mineralocorticoides, para cortisona, que não ativa o receptor. A enzima é altamente expressa em tecidos sensíveis aos mineralocorticoides tais como o rim. A deficiência genética leva à exposição dos receptores de mineralocorticoides a altas concentrações do ligante ativo, levando à hipertensão grave e à hipocalemia na síndrome do excesso aparente de mineralocorticoides

Vários hormônios podem controlar um processo ou um hormônio pode controlar vários processos

Embora possa ser conveniente pensar no sistema endócrino como sendo compartimentalizado de modo que um hormônio tenha controle sobre todo um processo, isso raramente é o caso. Por exemplo, pelo menos quatro hormônios diferentes estão envolvidos na regulação da concentração plasmática de glicose (Cap. 21). Alternativamente, um único hormônio, tal como a testosterona, pode influenciar uma série de processos metabólicos.

Todas essas características do sistema endócrino serão ilustradas por alguns ou por todos os eixos endócrinos que passam pela pituitária, a ser discutida posteriormente neste capítulo.

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DA AÇÃO HORMONAL

Os testes laboratoriais dos sistemas endócrinos têm como objetivos determinar se o sistema está funcionando anormalmente e localizar o defeito funcional. Mais comumente, isso significa que os níveis do hormônio que induzem a resposta fisiológica relevante nos tecidos-alvo são determinados, geralmente, por imunoensaio, juntamente com a medição de um ou mais hormônios tróficos anteriores, onde eles existem. A presença da regulação por retroalimentação negativa significa que o sistema tentará corrigir as perturbações nos níveis do hormônio efetor com mudanças compensatórias nos níveis dos hormônios tróficos. Logo, a avaliação de pelo menos dois pontos nessa alça de retroalimentação endócrina é essencial e permite a focalização do diagnóstico posterior por imagem na glândula envolvida.

Uma vez que os hormônios de maior interesse para o diagnóstico do problema clínico tenham sido escolhidos, deve-se ter cuidado para assegurar uma coleta apropriada. Isso deve ser levado em consideração se o hormônio for muito instável (p. ex., muitos hormônios peptídicos pequenos requerem que as amostras sanguíneas sejam colhidas em tubos no gelo contendo inibidores de proteases) e também se ele for produzido em um ritmo circadiano ou outro tipo de ritmo. Para alguns hormônios que têm meia-vida muito longa, tal como a tiroxina, o horário de coleta não é crítico, enquanto para outros, tal como o cortisol, a padronização desse horário é essencial.

Outro fator que deve ser levado em consideração no teste de hormônio é se a sua secreção é ou não pulsátil. Quase todos os hormônios hipotalâmicos e pituitários mostram algum grau de pulsatilidade na secreção. Na maioria dos casos isso significa simplesmente que é necessário repetir o teste, no caso de anormalidades leves, enquanto para alguns hormônios, como o hormônio do crescimento, que tem meia-vida curta e picos de secreção muito evidentes, as medições únicas são frequentemente sem sentido.

Por causa desses problemas, os endocrinologistas comumente solicitam dosagens múltiplas para construir um perfil dos níveis hormonais em vários pontos do dia. Isso pode ser um modo efetivo de detectar perturbações sutis no ritmo circadiano e também pode diminuir o impacto da secreção oscilatória do hormônio. Outra abordagem é usar o teste provocativo. Em outras palavras, os níveis hormonais são medidos não somente no estado de repouso, mas também após um estímulo significativo ter sido aplicado, em uma tentativa de avaliar a capacidade máxima de resposta da glândula ou do sistema endócrino que está sendo testado. Frequentemente, o estímulo é uma alta dose de hormônio trófico (p. ex., ACTH, TRH, GnRH etc.); no entanto, em vez disso, ele pode ser um desafio metabólico (p. ex., com carga oral de glicose ou hipoglicemia grave induzida por insulina para mimetizar o estresse). Exemplos de cada um desses testes são dados na Tabela 39.4.

Tabela 39.4 Exemplos de testes endócrinos provocativos comumente utilizados.

Eixo endócrino	Estímulo	Medição	Racional/uso
H-P-Adrenal	sintético	ACTH	o cortisol testa a integridade funcional das glândulas adrenais, que por sua vez depende das ações crônicas do ACTH. Esse é um teste indireto do eixo hipotálamo/pituitária
H-P-Adrenal	hipoglicemia induzida por insulina	cortisol	a hipoglicemia grave mimetiza o estresse fisiológico e testa confiavelmente o hipotálamo, diferentemente do teste com Synacthent
H-P-Tireoide	TRH	TSH	o padrão da liberação do TSH após a estimulação do TRH fornece informações que podem ser úteis no diagnóstico do hipotireoidismo central
H-P-Crescimento	hipoglicemia induzida por insulina	GH	a pulsabilidade basal do GH é superada pela aplicação de um forte estímulo para sua liberação
H-P-Crescimento	carga oral de glicose	GH	a falha da supressão do GH pela glicose é usada no diagnóstico da acromegalia

H-P, hipotálamo-pituitária.

PRINCIPAIS TIPOS DE PATOLOGIA ENDÓCRINA

Embora cada sistema endócrino possa funcionar anormalmente como consequência de uma doença ou um dano órgão-específico, por exemplo relacionado com o local anatômico da glândula, há também alguns tipos gerais de patologia nos quais as células endócrinas são muito suscetíveis. A primeira delas é a destruição autoimune por anticorpos glândula-específicos. Essa é uma causa potencial da perda de função de quase todas as glândulas endócrinas e, menos frequentemente, também pode levar a seu hiperfuncionamento. De fato, a autoimunidade contra a tireoide, a adrenal e as ilhotas pancreáticas é responsável por mais de 50% de todas as doenças autoimunes órgão-específicas. Isso parece, em parte, devido à predisposição genética, relacionada tanto com genes MHC quanto não MHC, e também por fatores ambientais pouco definidos (Cap. 21).

IMUNOENSAIO HORMONAL

O imunoensaio é a técnica mais amplamente aplicada para a medição dos níveis hormonais. São produzidos anticorpos que reconhecem regiões antigênicas do hormônio. Idealmente, esses anticorpos devem ter alta especificidade e alta afinidade pelo hormônio de interesse, p. ex., a subunidade β dos hormônios glicoproteicos.

Nos primeiros imunoensaios, os anticorpos eram obtidos do soro de uma espécie animal (p. ex., coelho ou carneiros), imunizados com preparações de hormônios humanos. Esses antissoros continham uma série de anticorpos distintos (policlonais) capazes de se ligar a diferentes sítios do antígeno (o hormônio). No entanto, a especificidade e a concentração do(s) anticorpo(s) variavam com o animal e a duração da resposta imunológica. Hoje, a maioria dos imunoensaios utiliza anticorpos monoclonais, que são produzidos pela fusão das células do baço de um camundongo imunizado com células de uma linhagem de mieloma de camundongo. As células fusionadas, ou hibridomas, podem ser clonadas para se obter uma linhagem celular que secreta uma única espécie de anticorpo por um período infinito de tempo.

Muitos produtores comerciais estabeleceram protocolos patenteados para quantificar a interação hormônio-anticorpo. Um dos formatos mais amplamente utilizados é o ensaio imunométrico de dois sítios (sanduíche) ou ELISA, esboçado na Figura 39.2. Esse ensaio utiliza dois anticorpos que se ligam a diferentes epítopos no hormônio, um dos quais é marcado ou modificado para ser capaz de gerar um sinal óptico. Sistemas espectrofotométricos, fluorométricos, de luminescência e traçadores (marcadores) radioquímicos estão comumente em uso.

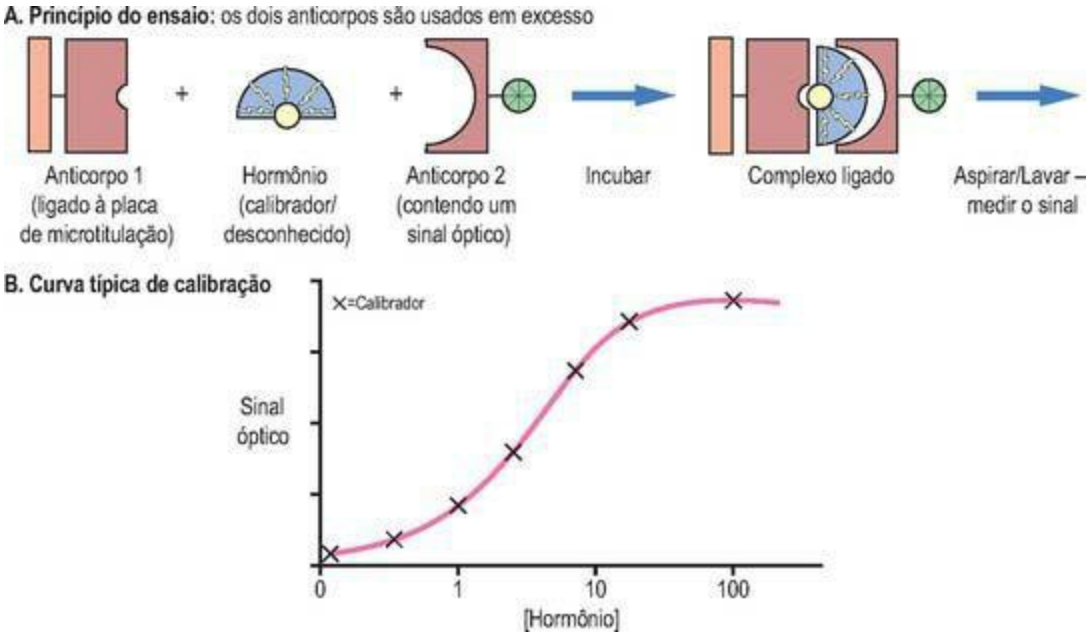


Fig. 39.2 Esquema para o ensaio imunoabsorvente em sanduíche ligado à enzima (ELISA) para a medição da concentração hormonal. A quantidade de sinal presente na microplaca após a lavagem do soro e reagentes é uma medida da concentração de um hormônio. (Compare com a Figura 40.2.)

Nem todos os imunoensaios utilizam anticorpos marcados: outras abordagens incluem a nefelometria, na qual a formação dos complexos antígeno-anticorpo imunológicos, desviadores de luz, é monitorada espectrofotometricamente.

QUANTIFICAÇÃO HORMONAL

PROBLEMA	SOLUÇÕES POSSIVEIS
Hormônio de vida curta ou instave1	Coletar a amostra corretamente e armazenar em gelo; considere a necessidade de inibi- dores de proteases como a aprotinina no tubo
Niveis hormonais ciclicos	Coletar somente em urn tempo determi- nado do ciclo para o qual a faixa normal foi estabelecida (p. ex., 9 horas da manhã para para o cortisol; fase folicular para amostra- gem

	de LH/FSH/estradiol))
Padrão altamente pulsátil de secreção (p. ex., GH)	Usar a media de coletas múltiplas com intervalos de tempo definidos ou usar urn estimulo provocativo antes da medição (p. ex., hipoglicemia)
Diversos pontos possiveis de disfunção no sistema	Coletas em dois pontos diferentes no eixo endócrino permitem a localização anatômica do problema (isto é, hormônio trófico mais o hormônio efetor; p. ex., TSH + T4, ACTH + cortisol)

O segundo grande grupo de patologias que se apresentam como doenças endócrinas é a neoplasia, a qual pode ser benigna ou maligna. As células neoplásicas surgem como clones autônomos nas glândulas endócrinas devido à s mutações somáticas nas vias de sinalização do fator de crescimento ou comumente nas vias de sinalização acopladas à proteína G. Elas podem produzir uma doença devido à produção excessiva e desregulada de hormônios biologicamente ativos ou devido a danos a células endócrinas normais vizinhas, com perda concomitante da secreção hormonal. Adenomas muito pequenos e benignos que permaneceriam não detectados nos tecidos não endócrinos podem produzir doença ruborizante em virtude da hipersecreção hormonal acoplada à potência do hormônio na indução de respostas biológicas.

O SISTEMA REGULADOR HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA

Os hormônios da pituitária posterior são distintos daqueles da pituitária anterior

A glândula pituitária (ou hipófise) é um órgão oval, do tamanho de uma ervilha, encaixado em uma cavidade óssea do crânio (*sella turcica*) abaixo do cérebro. Ela se comunica com o hipotálamo através da haste pituitária, que contém um arranjo complexo de axônios e vasos sanguíneos portais (Fig. 39.3). A glândula pituitária é dividida em dois lobos. A pituitária posterior (ou neuro-hipófise) é embriologicamente parte do cérebro e consiste principalmente em neurônios cujos corpos celulares estão nos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo. É nesses corpos celulares que os hormônios são sintetizados e empacotados antes do transporte pelos microtúbulos ao longo dos axônios na pituitária, onde são liberados. O lobo anterior (adeno-hipófise), representando aproximadamente 80% da glândula, é derivado embriologicamente do ectoderma oral e não tem continuidade anatômica direta com o cérebro. Diferentemente, ele pode ser visto como um órgão-alvo dos hormônios endócrinos liberados dos núcleos hipotalâmicos e transportados da eminência mediana pela circulação portal. Tanto a pituitária anterior como a posterior são controladas amplamente pelo hipotálamo, que é um centro altamente conectado ao SNC, recebendo sinais sinápticos de inúmeras partes diferentes do cérebro e sentindo sinais periféricos através de áreas de porosidade na barreira hematoencefálica. Logo, esses dois lobos do hipotálamo funcionam como um centro integrado que orquestra um número enorme de processos endócrinos e neurais, carreando estímulos externos relevantes a eles. Os sistemas endócrinos que envolvem o hipotálamo, a pituitária e os órgãos subsequentes são geralmente chamados de "eixos" e são vistos mais utilmente como unidades funcionais para os propósitos de diagnóstico e tratamento clínico (Fig. 39.4).

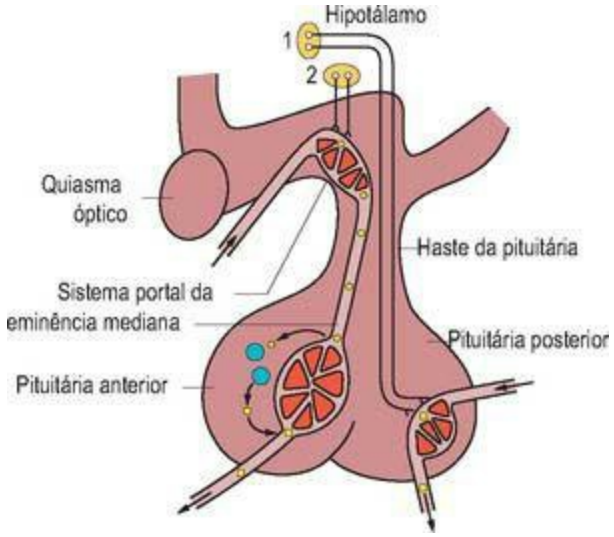


Fig. 39.3 O sistema regulador hipotálamo-pituitária anterior. Os hormônios da pituitária posterior são sintetizados e empacotados nos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo (1), transportados através dos axônios e armazenados na pituitária posterior antes da liberação para a circulação. Os hormônios que estimulam ou inibem a liberação de hormônios pela pituitária anterior são sintetizados em vários núcleos hipotalâmicos e (2) transportados para a eminência média. De lá eles viajam até a pituitária anterior através do sistema venoso portal.

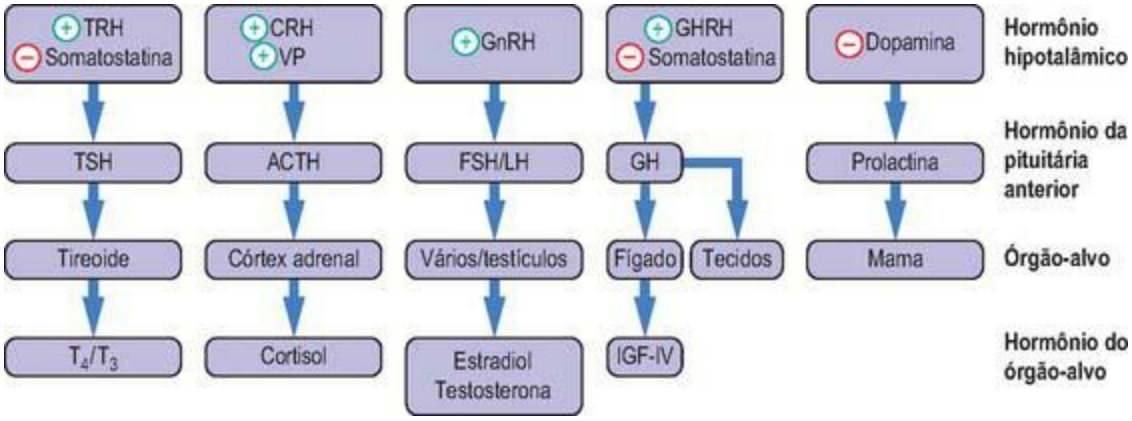


Fig. 39.4 Eixos reguladores do hipotálamo-pituitária anterior-órgãos-alvo. O sistema regulador hipotálamo-pituitária anterior compreende cinco eixos endócrinos paralelos, que regulam a biossíntese e a liberação de: (1) hormônios tireoidianos; (2) glicocorticoides; (3) esteroides sexuais; (4) hormônio do crescimento e (5) prolactina. T_4, tiroxina; T_3, tri-iodotironina; GHRH, hormônio liberador do hormônio do crescimento; GnRH, hormônio liberador de gonadotropina; IGF-I, fator de crescimento semelhante à insulina tipo I. (+) indica ação estimuladora e (–) ação inibidora.

Hormônios da glândula pituitária posterior

A glândula pituitária posterior secreta dois hormônios na circulação. A ocitocina é um pequeno hormônio peptídico que estimula a contração do músculo liso no útero e na mama; ela atua no parto e na lactação. A vasopressina (VP), também conhecida como hormônio antidiurético (ADH), é um peptídeo cíclico de nove aminoácidos com funções ligadas ao controle do metabolismo da água, e é descrito em detalhes no capítulo 23.

Hormônios do sistema regulador hipotálamo-pituitária anterior

Existem cinco eixos endócrinos separados dentro desse sistema (Fig. 39.4). Três deles são parte de um sistema endócrino complexo de três níveis no qual os hormônios da glândula pituitária (hormônio tireoestimulante, TSH; hormônio adrenocorticotrópico, ACTH; hormônio folículo-estimulante, FSH; e hormônio luteinizante, LH) podem ser vistos somente como hormônios tróficos para outros órgãos-alvo (isto é, tireoide, adrenais e gônadas). Nesses eixos, um controle sofisticado é exercido através de uma cascata na qual cada órgão endócrino no eixo amplifica tanto a quantidade de hormônio secretado quanto a meia-vida biológica do seu produto hormonal em comparação ao órgão anterior. O quarto eixo endócrino é um híbrido: o hormônio de crescimento (GH) tanto é um hormônio trófico como apresenta ações por si próprio. O quinto eixo endócrino medeia a secreção de prolactina, peculiar em não ser um hormônio trófico. As síndromes clínicas distintas são produzidas pela deficiência ou pelo excesso de qualquer um dos hormônios da pituitária anterior, exceto a prolactina, cuja deficiência não leva a problemas clinicamente significativos em humanos (Tabela 39.5).

Tabela 39.5 Condições clínicas associadas aos distúrbios do hormônio pituitário.

Distúrbios dos hormônios pituitários		
Hormônio	**Deficiência**	**Excesso**
TSH	hipotireoidismo	tireotoxicose
ACTH	hipoadrenalismo	doença de Cushing

FSH/LH	hipogonadismo	puberdade precoce
GH	estatura baixa	gigantismo/acromegalia
Prolactina	Nenhuma	galactorreia/infertilidade

O EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-TIREOIDE

Hormônio liberador de tireotropina (TRH)

O TRH é sintetizado no hipotálamo e transportado através da circulação portal para a pituitária onde, por fim, estimula a secreção de TSH

O TRH é um tripeptídio modificado sintetizado de modo pulsátil pelos núcleos hipotalâmicos peptidérgicos e transportado para a pituitária anterior pela circulação portal. O TRH estimula a síntese e a secreção do TSH pela sua ligação a receptores acoplados à proteína G na membrana da célula tirotrófica da pituitária que estão ligados à fosfolipase C. O aumento resultante no inositol trifosfato (IP3) intracelular estimula a liberação do cálcio a partir dos locais de armazenamento e leva, assim, à secreção do TSH pré-formado. As ações mais crônicas do TRH incluem a estimulação da biossíntese da subunidade do TSH e a glicosilação do TSH. O número de receptores TRH nos tireotrofos é regulado negativamente tanto pela concentração do próprio TRH quanto pelos hormônios tireoidianos.

Hormônio tireoestimulante

O TSH, ou tireotropina, é uma pequena glicoproteína sintetizada pelos tireotrofos pituitários. Ele consiste em duas subunidades interligadas não covalentemente e contém cerca de 15% de carboidratos. A cadeia α é idêntica à quela encontrada em outros hormônios glicoproteicos (LH; FSH; gonadotropina corônica β, βHCG) e, portanto, a especificidade é conferida pela cadeia β. A síntese de cada subunidade é realizada a partir de ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNAs) diferentes codificados por genes localizados em diferentes cromossomos. As cadeias laterais de carboidratos são misturas complexas de açúcares não modificados, acetilados e sulfatados. O TSH é secretado em um padrão que é tanto pulsátil quanto circadiano e tem uma meia-vida plasmática de cerca de 65 minutos.

O TSH atua na glândula tireoide e influencia aparentemente cada aspecto da biossíntese e da secreção do hormônio tireoidiano

O TSH, assim como o TRH, atua através de receptores específicos acoplados à proteína G. No entanto, nesse caso o receptor é expresso em células foliculares na glândula tireoide e está acoplado à adenil ciclase e, portanto, à proteína quinase A (ou proteína quinase dependente de AMPc). As proteínas quinases dependentes de AMPc controlam praticamente todos os aspectos da biossíntese e da secreção do hormônio tireoidiano, incluindo o transporte de iodetos, a formação da iodotironina, a proteólise da tiroglobulina e a deiodinação da tiroxina. O TSH também estimula o crescimento da glândula tireoide. De fato, a ativação de mutações somáticas no receptor de TSH é conhecida por ser responsável por muitos casos de bócio multinodular, um aumento irregular muito comum da glândula tireoide, particularmente quando associado à secreção excessiva do hormônio tireoidiano.

A retroalimentação negativa pelos hormônios tireoidianos ocorre tanto no nível hipotalâmico quanto no pituitário. Ao nível pituitário, a tiroxina (T_4) e a tri-iodotironina (T_3) inibem a secreção de TSH pelas diminuições da biossíntese e da liberação do TSH através da regulação da transcrição gênica e da glicosilação do TSH. O T_3, a forma biologicamente ativa do hormônio, é um inibidor retroativo mais potente do que o T_4 e, na verdade, a maior parte da inibição retroativa pelo T_4 requer antes sua conversão intracelular para T_3 pela deiodinase tipo 2.

TRANSPORTADORES DO HORMÔNIO TIREOIDIANO

Tradicionalmente, pensava-se que os hormônios planos e lipofílicos como os esteroides e os hormônios tireoidianos simplesmente se difundiam através das bicamadas lipídicas para alcançar seus receptores intracelulares. Porém, nos últimos anos, foi demonstrado que a proteína MCT8 da membrana plasmática funciona como um transportador do hormônio tireoidiano e que a deficiência genética da proteína leva a um retardo psicomotor grave e a altas razões T_3: T_4. Contudo, os pacientes afetados não apresentam características periféricas de hipotireoidismo. Se existem diferentes transportadores do hormônio tireoidiano nos tecidos periféricos e se outros hormônios lipofílicos também têm mecanismos específicos similares que governam a entrada na célula continuam sendo questões interessantes.

Tiroxina e tri-iodotironina

O T_4 é produzido exclusivamente na glândula tireoide e é mais abundante do que o T_3, que é a forma biologicamente ativa

O T_4 (também conhecido como tetraiodotironina) e o T_3 são moléculas estruturalmente simples, sendo tironinas iodinadas produzidas pelo acoplamento de um grupo fenila obtido a partir de uma tirosina ao grupo fenila de outra tirosina intacta (Fig. 39.5). A biossíntese de T_4 e T_3 ocorre na superfície da tireoglobulina, uma glicoproteína grande rica em tirosina, que é responsável por cerca de 75% do conteúdo proteico da glândula tireoide. A iodinação (ou iodetação) da tireoglobulina ocorre após ela ter sido secretada para o lúmen folicular, e a secreção de T_4 e T_3 requer a hidrólise enzimática da tireoglobulina, que está localizada no coloide folicular. Durante a hidrólise e a subsequente deiodinação, o iodeto liberado é conservado e reutilizado (Fig. 39.6).

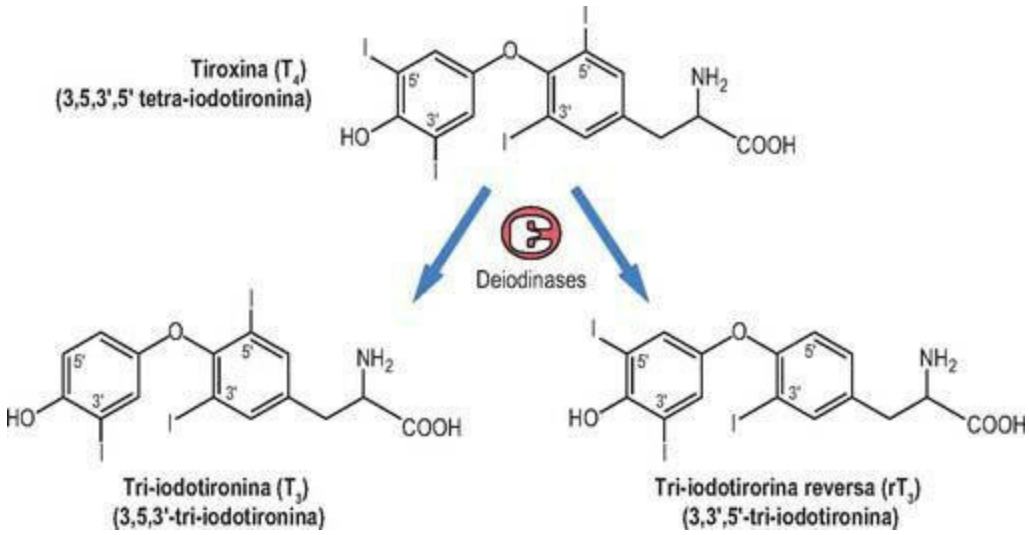


Fig. 39.5 Estruturas dos hormônios tireoidianos T_4, T_3 e rT_3.

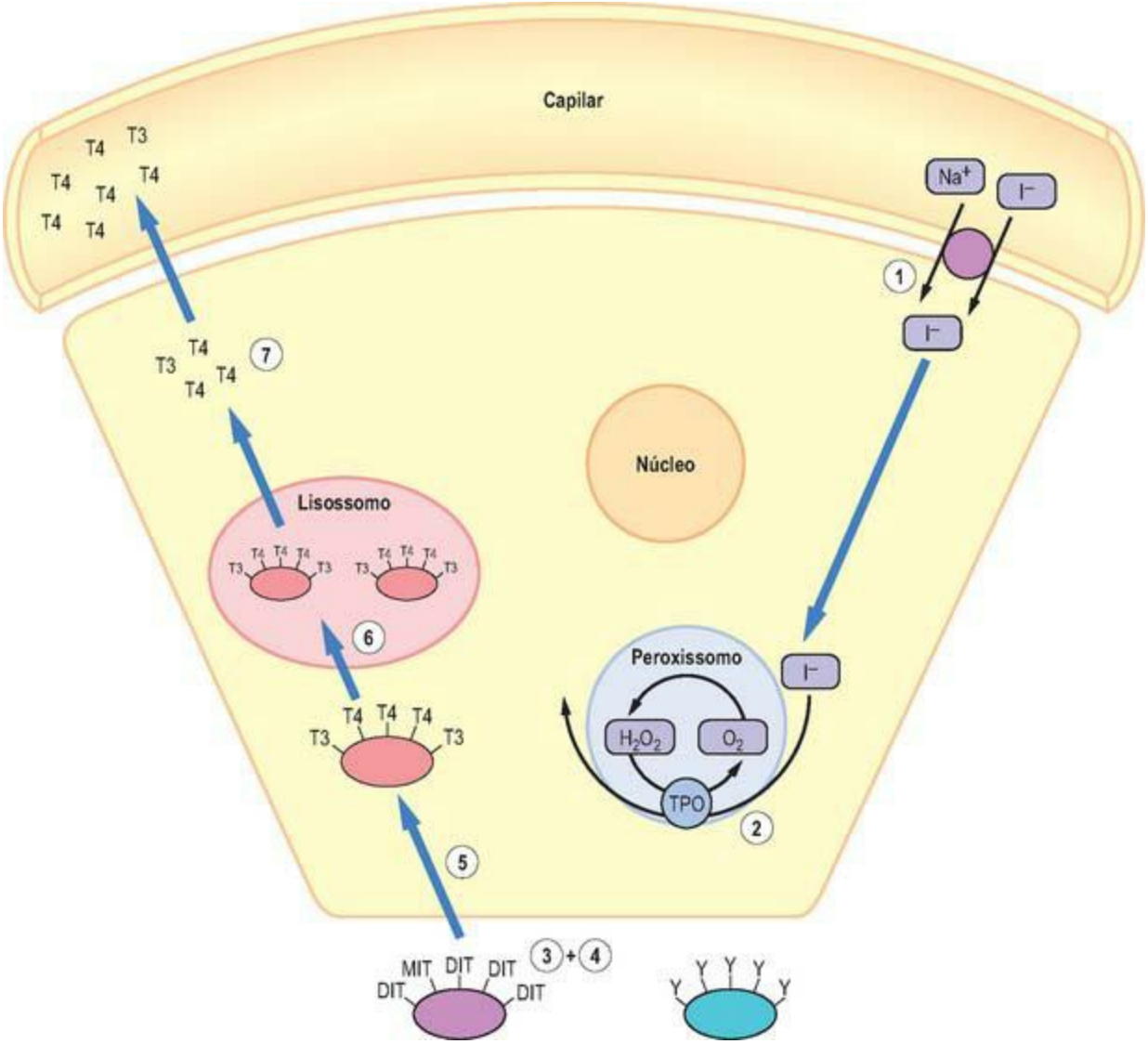


Fig. 39.6 Mecanismo da biossíntese dos hormônios tireoidianos. 1. O iodeto é concentrado nas células epiteliais foliculares após a entrada através de um simportador de sódio e iodeto, antes da **2.** oxidação pela peroxidase tireoidiana (TPO) no peroxissomo para iodo. **3.** Na membrana plasmática, adjacente ao lúmen folicular, ocorre a conversão de resíduos tirosil (Y) na superfície da tireoglobulina, tanto para a monoiodotirosina (MIT) quanto para di-iodotirosina (DIT). **4.** Há então o acoplamento das tirosinas iodinadas para formar T_4 (DIT + DIT) ou T_3 (MIT + DIT). **5.** A tireoglobulina é endocitada e **6.** hidrolizada nos lisossomos para liberar T_3 e T_4 livres. **7.** Os hormônios tireoidianos são transportados para a membrana plasmática e liberados na corrente sanguínea por mecanismos que ainda não estão claros. O TSH influencia aparentemente cada etapa da síntese do hormônios tireoidianos e da liberação através da via AMPc/proteína quinase A.

A bioatividade do hormônio tireoidiano é regulada pelo controle da conversão do T_4 em T_3 pela deiodinação; esta é mediada por três enzimas deiodinases

Cerca de 80-90% do hormônio tireoidiano secretado pela glândula tireoide é de T_4, com T_3 sendo o componente minoritário. Contudo, o T_3 produzido pela deiodinação 5′ do T_4 é a forma biologicamente ativa, e o T_4 pode ser visto como um pró-hormônio. A deiodinação 5′ pode ocorrer na glândula tireoide, em tecidos-alvo ou em outros tecidos periféricos, e é realizada pelas iodotironina deiodinases 1 e 2 (DI1 e DI2). A enzima tipo 2 é particularmente importante no controle dos níveis nucleares de T_3, enquanto o papel fisiológico da deiodinase tipo 1, cineticamente ineficiente, não está claro até agora. A enzima tipo 3 é a principal enzima catabólica; ela catalisa a remoção de um iodeto da posição 3 em vez da posição 5′, resultando em um T_3 reverso (rT_3) que é inativo e deiodiniza e inativa similarmente o T_3. Assim, o controle da deiodinação do T_4 é um meio

de controlar a bioatividade do hormônio tireoidiano (Fig. 39.5). Cerca de 80% do T_4 é metabolizado por deiodinação, com quantidades quase iguais de T_3 e rT_3 sendo produzidas. O T_4 restante é conjugado ao sulfato ou ao ácido glicurônico e desativado por desamidação ou descarboxilação. Em doenças graves existem boas evidências de que a ativação de T_4 para T_3 pela DI1 e DI2 está prejudicada, enquanto a expressão de DI3 está aumentada. Isso resulta em níveis baixos de T_3, o que é uma característica precoce da chamada "síndrome da eutireoide doente".

A fração biologicamente ativa de T_3 e T_4 no plasma (T_3 e T_4 livres, isto é, a fração que não está ligada a proteínas) representa, em cada caso, menos de 1% da concentração total do hormônio

A produção diária de T_4 é aproximadamente 10% do conjunto extratireoidiano, a maior parte da qual ligada à TBG (globulina ligante de hormônios da tireoide) ou à albumina no plasma. Aproximadamente 80% desse T_4 é convertido a T_3 pela deiodinação extratireoidiana. A reposição do T_3 é muito maior do que de T_4. A fração biologicamente ativa de T_4 e de T_3 no plasma é a fração livre – não ligada a proteínas. Essa fração, que é uma medida do estado de hormônio tireoidiano, representa menos de 1% do total de T_4 e T_3. A maioria dos laboratórios clínicos analisa agora os níveis de hormônio livre especificamente para evitar problemas na interpretação dos níveis totais do hormônio causados pelas flutuações nas proteínas ligantes.

Ações bioquímicas dos hormônios tireoidianos

Os hormônios tireoidianos podem ser considerados como o pedal acelerador do metabolismo

O T_3 aumenta a taxa metabólica de amplo grupo de tecidos e por isso aumenta a taxa metabólica basal do corpo inteiro. A maioria dessas ações resulta da ligação do T_3 a seu receptor nuclear (Cap. 40) e da alteração nas taxas de transcrição dos genes nos tecidos-alvo. Dentre as muitas alterações celulares que resultam desse programa alterado de expressão gênica, foi mostrado que os hormônios tireoidianos aumentam a utilização de ATP pela elevação na atividade da ATPase (Na^+/K^+)-dependente e aumento do metabolismo oxidativo mitocondrial, em parte pela regulação positiva direta dos fatores-chave da biogênese mitocondrial. A lipólise do tecido adiposo também é estimulada pela ativação, dependente de AMPc, da lipase sensível ao hormônio, liberando assim ácidos graxos que podem ser oxidados para gerar o ATP usado para a termogênese. Aumentos na glicogenólise e na gliconeogênese ocorrem para balancear o uso elevado de glicose como um combustível da termogênese. A taxa de síntese de muitas proteínas estruturais, enzimas e outros hormônios, também é afetada como resultado da ação do hormônio tireoidiano, e a "transcriptômica" baseada em microarranjos (Cap. 36) agora pode ser usada para definir as muitas centenas ou milhares de genes cuja expressão é alterada pela ativação do receptor do hormônio tireoidiano.

A doença da tireoide é comum, afetando quase 3% da população; as mulheres são nove vezes mais afetadas do que os homens

Mais de 95% das doenças tireoidianas se originam na glândula tireoide, e a maioria delas é de origem autoimune. Os anticorpos podem surgir contra diversos componentes das células tireoidianas, incluindo os microssomos ricos em peroxidase. Ocorrem a infiltração de linfócitos e a destruição progressiva da glândula tireoide, levando ao hipotireoidismo, o tipo mais comum de disfunção tireodiana. Alguns autoanticorpos contra a tireoide se ligam ao receptor TSH. Se os autoanticorpos se ligam mas não estimulam a glândula, a produção do hormônio tireoidiano diminui, e o paciente se torna hipotireoideo (ou hipotiroideu), com aumento do TSH plasmático e redução no T_4 livre. No entanto, se os autoanticorpos se ligam e a estimulam, eles mimetizam o efeito do TSH, interrompendo a alça de retroalimentação negativa normal, produzindo uma secreção tireoidiana excessiva, e o paciente estará hipertireoideo (hipertiroideu; tireotóxico) com o T_4 livre plasmático aumentado e o TSH suprimido.

HIPOTIREOIDISMO

Uma mulher de 60 anos de idade vem à clínica reclamando de ganho de peso, intolerância ao frio e fadiga. Ela também diz que recentemente se tornou menos alerta mentalmente, mas atribui isso à idade. Ao ser questionada, admite que também tem sofrido de constipação grave ultimamente. Ela relata que dois membros da sua família tiveram "problemas tireoidianos". Ao exame, está moderadamente obesa, tem pele seca e fria, face inchada e taxa cardíaca lenta de 50 batimentos por minuto. A glândula tireoide não é palpável. Sua tiroxina livre (T_4) estava em 5 pmol/L (faixa normal: 9-25 pmol/L) e o TSH era de 60 mU/L (faixa normal: 0,4-4 mU/L).

Comentário. Os sintomas do hipotireoidismo em estágio inicial podem ser bastante inespecíficos. O melhor teste de laboratório para o diagnóstico de hipotireoidismo é a concentração plasmática de TSH. O nível elevado de TSH sugere distúrbio primário da tireoide. Subsequentemente, o sangue dessa senhora mostrou ser positivo para anticorpos antimicrossomais e antitireoglobulina. Um diagnóstico de tireoidite linfocítica (tireoidite de Hashimoto) foi definido. Ela foi tratada com tiroxina.

HIPERTIREOIDISMO

Uma mulher de 35 anos de idade veio ao seu médico reclamando de palpitações, dificuldade de subir escadas e fadiga generalizada. Também disse que perdeu 4 kg recentemente, a despeito do bom apetite e nenhuma tentativa de dieta. Relatou diarreia ocasional e sangramentos menstruais ocasionais e leves, cada vez mais frequentes.

Ao exame, sua pele estava quente e úmida, e ela tinha tremores leves das mãos quando estendidas. Apresentava fraqueza leve dos músculos da coxa e taquicardia (110/min). Tinha aumento brando da tireoide (bócio, papeira) e uma proeminência sobre a glândula. Testes da função

tireoidiana mostraram nível suprimido de TSH (<0,05; faixa normal: 0,4-4 mU/L) e tiroxina (T_4 = 29; faixa normal: 9-25 pmol/L) e tri-iodotironina (T_3 = 25; faixa normal: 3,5-6,5 pmol/L) aumentadas. Anticorpos contra receptores tireoidianos foram detectados.

Comentário. No hipertireoidismo, o nível de TSH é suprimido pelos altos níveis de hormônios tireoidianos circulantes. O nível baixo de TSH e as concentrações altas do hormônio tireoidiano sugerem hipertireoidismo. A presença de anticorpos para receptores tireoidianos confirma que a causa é a doença de Graves, um distúrbio tireoidiano autoimune.

As causas hipotalâmicas e hipofisárias do hipotireoidismo são frequentemente resultado da secreção prejudicada de TSH consequente à pressão de um tumor adjacente. Os tumores pituitários secretores de TSH são uma causa extremamente rara de hipertireoidismo, e frequentemente produzem razões altamente anormais da subunidade α sobre a subunidade β do TSH e padrões anormais de glicosilação do TSH, o que pode ser útil no diagnóstico.

O EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL

Hormônio liberador de corticotropina (CRH)

O CRH é um peptídeo de 41 aminoácidos secretado pelo núcleo paraventricular (PVN). Ele se liga ao receptor acoplado à proteína G das células corticotrópicas da pituitária atuando através do segundo mensageiro do sistema, o AMPc, que estimula tanto a síntese quanto a secreção do ACTH. Um segundo hormônio do PVN, a vasopressina (VP), potencializa a resposta da pituitária ao CRH, em parte pelo aumento na quantidade e na extensão da expressão do receptor do CRH. A retroalimentação negativa pelo cortisol inibe tanto a secreção do CRH quanto da VP, assim como reduz a responsividade dos corticotropos à estimulação.

Hormônio adrenocorticotrópico (ACTH)

O ACTH é sintetizado com uma molécula precursora de 241 aminoácidos, a pró-opiomelanocortina (POMC). A POMC é clivada em múltiplos sítios para liberar vários peptídeos hormonalmente ativos, incluindo as endorfinas e os hormônios estimuladores dos melanócitos. Excluindo a pituitária, a POMC também pode ser produzida em grande quantidade por certos tipos de câncer, dando origem à síndrome ectópica de produção de ACTH.

O ACTH é composto de 39 aminoácidos com a atividade biológica residindo nos 24 resíduos *N*-terminais. Ele é secretado em surtos relacionados com o estresse, superpostos a um rimo diurno peculiar que mostra um pico à s 5 horas. Ele é transportado livre no plasma e tem meia-vida de cerca de 10 minutos. O ACTH estimula a síntese e a liberação dos hormônios glicocorticoides pela interação com receptores de superfície em células do córtex adrenal acoplados à proteína G, que, por sua vez, estimula a produção de AMPc. Aumentos agudos na síntese adrenal de cortisol ocorrem em três minutos, principalmente pela estimulação da atividade da colesterol esterase. Os efeitos em longo prazo do ACTH incluem a indução da transcrição dos genes que codificam as enzimas esteroidogênicas e a manutenção das zonas fasciculada e reticular da glândula, significando que a falta prolongada de ACTH eventualmente abole a capacidade da glândula de responder a um desafio agudo paraindução de aumento da síntese de cortisol e androgênios (Cap. 17).

A retroalimentação negativa pelo cortisol ocorre em dois espaços de tempo, atuando tanto em nível hipotalâmico quanto pituitário. A retroalimentação rápida altera a liberação do CRH hipotalâmico e a secreção de ACTH mediada por CRH. A retroalimentação lenta resulta da síntese reduzida do CRH mais a supressão da transcrição gênica da POMC, que resulta na síntese reduzida de ACTH.

Biossíntese do cortisol

No homem, o cortisol é o principal glicocorticoide, sintetizado no córtex adrenal e está sob o controle direto do ACTH pituitário

Um esquema simplificado da biossíntese de esteroides é mostrado na Figura 39.7 (ver também a Figura 17.11). O colesterol é o precursor de todos os hormônios esteroides. A clivagem da cadeia lateral do colesterol libera os corticosteroides C-21; clivagens adicionais dessa cadeia lateral produzem os androgênios C-19, e a aromatização do anel A resulta nos estrogênios C-18. As estruturas dos hormônios esteroides-chave são mostradas no capítulo 17. Várias das enzimas esteroidogênicas são membros da superfamília de oxidases do citocromo P-450 (Cap. 29).

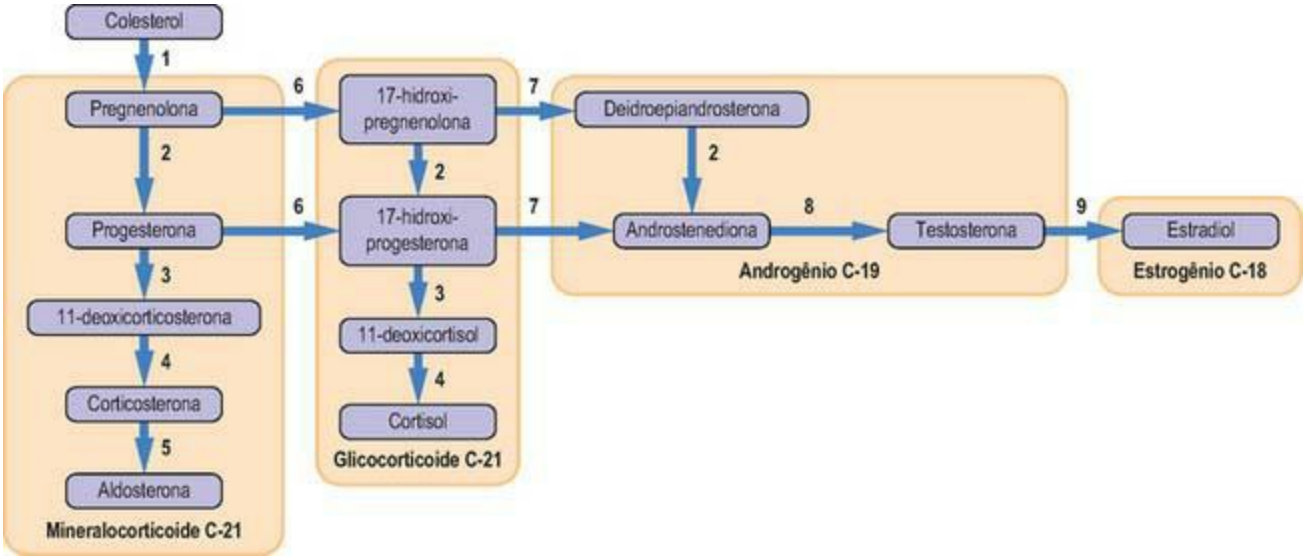


Fig. 39.7 Resumo da biossíntese dos hormônios esteroides. 1, colesterol 20,22 desmolase; **2,** 3β-hidroxiesteroide desidrogenase $\Delta\alpha^{4,5}$-oxoesteroide isomerase; **3,** 21-hidroxilase; **4,** 11-hidroxilase; **5,** aldosterona sintase; **6,** 17α-hidroxilase; **7,** 17,20-liase/desmolase; **8,** 17β-hidroxiesteroide desidrogenase; **9,** aromatase. Essas enzimas fazem parte da superfamília das mono-oxigenases citocromo P450 dependentes de NADPH (Cap. 29; compare com as Figuras 17.10 e 17.11).

A concentração plasmática do cortisol mostra um ritmo diurno pronunciado, sendo cerca de 10 vezes maior à s 8 horas do que à s 24 horas. Isso acompanha o ritmo diurno marcante da secreção do ACTH. Aproximadamente 95% do cortisol no plasma está ligado a proteínas, principalmente CBG. À medida que a concentração do cortisol aumenta, o percentual de cortisol livre também aumenta, indicando que a ligação à CBG (globulina ligante de cortisol) é saturável. O cortisol tem uma meia-vida no plasma de cerca de 100 minutos. Ele é metabolizado no fígado e em outros órgãos pela combinação de redução, clivagem das cadeias laterais e conjugação, dando origem a um grande número de metabólitos inativos que são excretados na urina.

O cortisol tem diversos efeitos no metabolismo e no crescimento/reparo dos tecidos

O cortisol tem ampla faixa de efeitos no metabolismo, na função imunológica, no sistema cardiovascular e no esqueleto, mediados pelas alterações nos níveis de expressão de milhares de genes. Como o nome glicocorticoide sugere, o cortisol tem grande influência na homeostase da glicose: ele é um hormônio contrarregulador, trabalhando através de receptores nucleares para induzir a biossíntese das enzimas gliconeogênicas e, ao mesmo tempo, inibir a captação de glicose e

o seu uso pelos tecidos periféricos (Cap. 21). A síntese e a deposição de glicogênio estão aumentadas e a lipólise estimulada no tecido adiposo. As sínteses de proteína e RNA são estimuladas no fígado, mas inibidas nos músculos; a proteólise no músculo gera os aminoácidos substratos para a gliconeogênese hepática. O cortisol atua em conjunto com diversos outros hormônios, incluindo a insulina e o GH na regulação do metabolismo intermediário, e seus efeitos metabólicos são mais bem compreendidos como parte de uma resposta endócrina ao estresse fisiológico (Cap. 21).

O cortisol também modula o sistema imunológico através dos efeitos na produção de citocinas e no aumento da apoptose de leucócitos, efeitos que são explorados farmacologicamente no uso de glicocorticoides potentes para tratar condições inflamatórias. Além disso, ele é permissivo, favorecendo o efeito de vários vasoconstritores como as catecolaminas, apresenta efeitos diretos no coração e nos rins, onde acentua a eliminação de água e a reabsorção de eletrólitos, e nos ossos, influenciando a sua reposição através de uma variedade de mecanismos.

Distúrbios clínicos da secreção de cortisol

A hipossecreção de cortisol pode ocorrer como resultado das falências do hipotálamo, da pituitária ou da adrenal

O diagnóstico da causa da hipossecreção de cortisol depende da apresentação clínica, da medição no momento correto do cortisol e do ACTH e da extensão da resposta do cortisol ao ACTH sintético (Synacthen).

As deficiências do CRH e do ACTH são frequentemente acompanhadas de deficiências de outros hormônios hipotalâmicos ou pituitários. A doença de Addison é a falência adrenal primária na qual a secreção de todos os hormônios adrenais está diminuída, geralmente por causa de doença autoimune ou infecção (p. ex., tuberculose ou citomegalovírus). Bioquimicamente, ela é caracterizada por hiponatremia, hipercalemia, acidose e resposta prejudicada de produção do cortisol ao Synacthen, junto com um ACTH plasmático elevado. A reposição do cortisol, geralmente em conjunto com os mineralocorticoides, é um tratamento efetivo para essa condição de risco de vida. Como os glicocorticoides também estão envolvidos na eliminação normal da água, sua deficiência pode mascarar uma deficiência coexistente de ADH e a sua reposição leva a uma diurese drástica. Além disso, a doença de Addison pode estar associada a um TSH significativamente elevado, o que se resolve com a terapia por glicocorticoides. Isso é importante para reconhecer um diagnóstico inicial errado de hipotireoidismo primário, e um tratamento com tiroxina pode exacerbar perigosamente os sintomas do hipoadrenalismo.

Raramente, a hipossecreção de cortisol resulta de um distúrbio genético na via biossintética dos esteroides: hiperplasia adrenal congênita. A enzima mais frequentemente afetada é a esteroide 21-hidroxilase (Fig. 39.7). Na deficiência quase completa da enzima, a deficiência de cortisol e de aldosterona acarreta a perda de sais, levando a hiponatremia nos primeiros dias de vida. Devido à perda da retroalimentação negativa pelo cortisol, os níveis de ACTH aumentam na tentativa de oferecer quantidades maiores do substrato 17-hidroxiprogesterona (17OHP) (Fig. 39.8) para contornar o bloqueio enzimático. Contudo, a 17OHP é também convertida em androgênios, e a superprodução deles pode masculinizar a genitália feminina externa antes do nascimento. Defeitos parciais na enzima podem ser compensados por níveis circulantes elevados de ACTH, suficientes para manter os níveis de cortisol, embora a produção de metabólitos próximos à enzima defeituosa na via ainda ocorra. Consequentemente, isso se apresenta em meninas adolescentes como hirsutismo (crescimento de tipo e distribuição de pelos masculinos na mulher) e irregularidade menstrual. O perfil de esteroides de um paciente com hiperplasia adrenal congênita é dado na Figura 17.12.

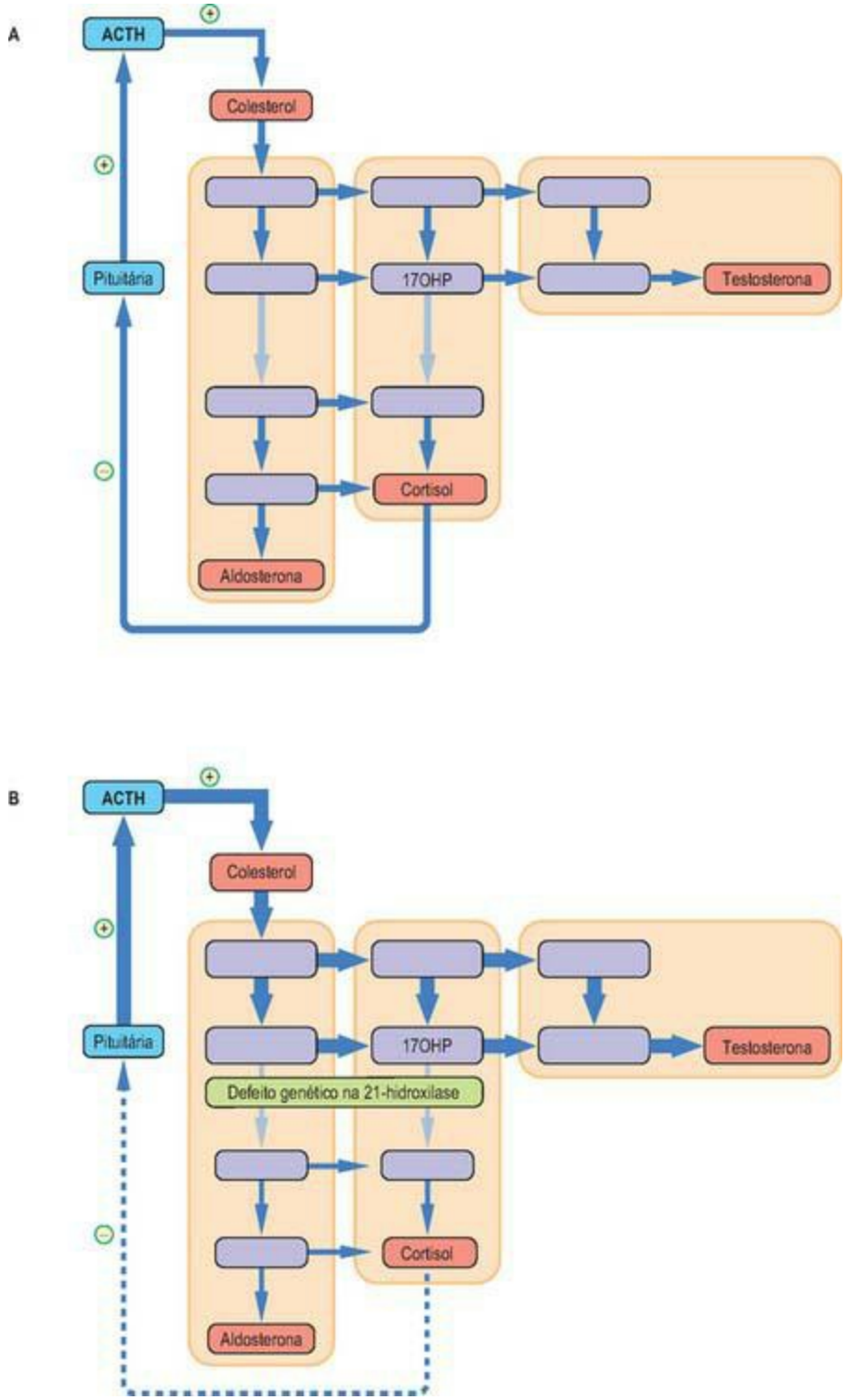


Fig. 39.8 Os níveis altos de androgênios na hiperplasia adrenal congênita são decorrentes da perda da retroalimentação negativa pelo cortisol. (A) Retroalimentação negativa normal exercida pelo cortisol no hipotálamo e na pituitária. (B) A deficiência da 21-hidroxilase leva à perda seletiva do cortisol e da aldosterona, perda da retroalimentação negativa e à hipersecreção do ACTH na tentativa de corrigir o defeito. O excesso de ACTH direciona o fluxo aumentado através de todos os ramos das vias anteriores ao defeito, levando ao hiperandrogenismo clínico. 17OHP, 17-hidroxiprogesterona.

A hipersecreção do cortisol resulta na síndrome de Cushing, de longe o mais desafiador de todos os distúrbios endócrinos

Os glicocorticoides exógenos, comumente receitados para suprimir o sistema imune em uma série de condições inflamatórias, são as causas mais comuns da síndrome de Cushing. No entanto, a síndrome de Cushing também pode resultar de distúrbios do hipotálamo, da glândula pituitária (cerca de 80%) ou adrenal (cerca de 15%), ou pode ser a consequência da síndrome ectópica do ACTH. O

excesso de cortisol leva à redistribuição do tecido adiposo, com deposição de gordura na face e no tronco, e à perda de gordura nos membros, perda de músculo esquelético, afinamento da pele e cicatrização lenta (Fig. 39.9). O excesso de cortisol também produz comumente o diabetes e a hipertensão, e geralmente suprime o eixo hipotalâmico-gonadal, visto como perda da menstruação nas mulheres.



Fig. 39.9 Síndrome de Cushing decorrente da hipersecreção de cortisol.

INSUFICIÊNCIA ADRENAL PRIMÁRIA – UMA EMERGÊNCIA ENDÓCRINA

Uma mulher de 40 anos foi socorrida na emergência médica após um desmaio em casa, dois dias após contrair gripe. Por um ano ela se queixou de fraqueza crônica e fadiga, e ultimamente de dor abdominal, náusea, vômito, anorexia e confusão mental. Ela esteve desidratada e hipotensiva com pigmentação das dobras palmares e da mucosa bucal. A análise bioquímica revelou Na^+ de 115 mmol/L (135-145 mmol/L); K^+ de 5,9 mmol/L (3,5-5,0 mmol/L); ureia, 12 mmol/L (2,5-6,5 mmol/L), e glicose, 2,9 mmol/L (4,0-6,0 mmol/L). O nível basal sérico de cortisol era de 95 nmol/L, aumentado para 110 nmol/L 30 minutos após a administração de ACTH sintético (Synacthen).

Comentário. Essa é uma apresentação aguda da doença de Addison resultante da destruição autoimune progressiva do córtex adrenal. Os sintomas não específicos da deficiência de cortisol se tornaram críticos após o estresse de pequena doença mínima. A hipotensão e o desequilíbrio eletrolítico resultam da deficiência de mineralocorticoides. A pigmentação é relativa ao elevado ACTH e a outros peptídios derivados da POMC como os hormônios estimuladores dos melanócitos. O diagnóstico é obtido pela resposta deficiente de produção de cortisol ao ACTH sintético. O tratamento é a reidratação salina intravenosa mais uma dose grande (*bolus*) de hidrocortisona intravenosa seguida de terapia de manutenção diária com hidrocortisona e um mineralocorticoide. Outras doenças autoimunes coexistem comumente no paciente ou em sua família. A frequência aumentada da hipoglicemia grave nos pacientes com o diabetes do tipo 1 é uma ocorrência a ser vigiada, por causa da perda dos efeitos contrarregulatórios da glicose pelo cortisol.

SÍNDROME DE CUSHING – UM DILEMA NO DIAGNÓSTICO

Uma mulher de 45 anos de idade apresentou fadiga, ganho rápido de peso com obesidade central, estufamento e vermelhidão da face (conhecida como "pletora") e perda dos períodos menstruais regulares. Ela estava levemente hipertensiva e o médico de família também a diagnosticou como diabética, motivo pelo qual ela recebeu aconselhamento alimentar. O cortisol urinário era de 1.000 nmol/24h (normal <250 nmol/24h); o cortisol sérico era de 500 nmol/L à s 24 h (normal <50 nmol/L) e seu cortisol à s 8 h era de 550 nmol/L após 1 mg de dexametasona (um potente glicocorticoide sintético) (normal <50 nmol/L). O ACTH plasmático era de 100 ng/L (normal (<80 ng/L).

Comentário. Essa mulher tinha hipercortisolismo, conhecido como síndrome de Cushing. O cortisol elevado na urina, o cortisol sérico elevado à meia-noite e a falha na supressão após a administração de dexametasona suportam o diagnóstico. O resultado do ACTH indica que a causa é um tumor da pituitária (mais provavelmente) ou uma secreção ectópica de ACTH de um tumor oculto (provavelmente carcinoide). Nesse caso, o imageamento por ressonância magnética (IRM) da pituitária revelou um tumor claro de 0,5 cm de diâmetro; o diagnóstico da síndrome de Cushing e a localização do problema não são frequentemente tão fáceis! A cirurgia da pituitária é o tratamento definitivo apropriado nesse caso.

O diagnóstico da síndrome de Cushing pode ser extremamente exigente por diversas razões.

- Por causa da variação circadiana pronunciada nos níveis séricos de cortisol, a medição randômica do cortisol é de pouca utilidade no diagnóstico da síndrome de Cushing. Em seu lugar, o cortisol urinário livre de 24 h, que fornece uma medida da produção total de cortisol ao longo de um dia, é o teste mais comum.

- Um perfil circadiano anormal da secreção de cortisol, com níveis significativos sustentados à noite, quando estes geralmente são quase indetectáveis, pode produzir a síndrome de Cushing, mesmo que haja pequeno ou mesmo nenhum aumento na produção diária total do cortisol. Isso pode ser detectado pela dosagem do cortisol à s 9 h e à meia-noite, mostrando a perda do ritmo circadiano normal. Se o teste for realizado cuidadosamente sem provocar resposta endócrina ao estresse pela coleta do sangue, ele pode ser um meio sensível de detectar o hipercortisolismo.

- A síndrome endógena de Cushing geralmente surge a partir de tumores secretórios autonomamente funcionais. Alguns dos desafios no diagnóstico da síndrome de Cushing surgem do comportamento variável de tais tumores durante sua evolução. Algumas vezes, somente uma hipersecreção episódica de cortisol é observada, com testes de resultado normal entre os episódios, e à s vezes a expressão de receptores aberrantes devido a mutações somáticas significa que os níveis do cortisol são secretados em resposta a outros hormônios, como os peptídeos derivados do intestino.

Uma vez que os problemas de teste foram superados e o excesso de cortisol circulante demonstrado, o sítio anatômico do problema pode ser investigado utilizando-se uma série de testes que podem incluir medições do ACTH, testes de supressão da produção de ACTH pela dexametasona (um glicocorticoide sintético) e cateterização venosa seletiva da pituitária ou das glândulas adrenais. O tratamento definitivo é geralmente cirúrgico e deve ser orientado para a causa primária da condição. Antes, alguns meios médicos para a redução da síntese do cortisol são

geralmente utilizados na preparação para a cirurgia.

O EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-GÔNADAS

Hormônio liberador de gonadotropina (GnRH)

O GnRH é essencial para a secreção do FSH (hormônio folículo-estimulante) e do LH (hormônio luteinizante) intactos

O hipotálamo tem o papel principal no controle da função gonadal, tanto em machos quanto em fêmeas. A frequência e a amplitude aumentadas dos pulsos hipotalâmicos do GnRH é o primeiro estágio mensurável do início da puberdade. O GnRH, subsequentemente, estimula a secreção do FSH e do LH. O GnRH é um decapeptídeo sintetizado por vários núcleos hipotalâmicos e transportado para a pituitária pelo sistema portal. É secretado de modo pulsátil e induz a síntese e a secreção do FSH e do LH. Sua liberação está sujeita à retroalimentação negativa pela progesterona, prolactina e, algumas vezes, estrogênio, entre outros hormônios. O GnRH atua através de seu receptor de superfície celular para aumentar o cálcio intracelular, hidrolisar os fosfoinositídios e ativar a proteína quinase C. Os agonistas do GnRH de ação prolongada também podem causar uma regulação negativa dos receptores de GnRH, levando a uma secreção diminuída de FSH e LH. Esses agonistas são utilizados atualmente para tratar câncer de próstata e para preparar mulheres inférteis para programas de concepção assistida.

DOENÇA DE CUSHING DO OMENTO?

A enzima 11β-hidroxiesteroide desidrogenase (11βHSD) tipo II metaboliza o cortisol a cortisona inativa, protegendo assim os receptores de mineralocorticoides da exposição aos altos níveis do ligante ativo no rim. Uma segunda enzima intimamente relacionada, a 11βHSD tipo I, é amplamente expressa em tecidos como o tecido adiposo, os ossos e o cérebro. Embora ela catalise a mesma reação, a direção da reação nas células é geralmente contrária, levando ao aumento no cortisol ativo relativo à cortisona. Foi sugerido que os altos níveis dessa atividade amplificadora intracelular de glicocorticoides nas células da gordura omental poderiam contribuir para a obesidade central e a síndrome metabólica na ausência de qualquer excesso circulante de cortisol. (O omento é a dobra peritonial que suporta o estômago e as vísceras dentro da cavidade abdominal.) Independentemente de a atividade elevada da 11βHSD desempenhar ou não um papel no desenvolvimento da síndrome metabólica, sua inibição pode vir a ser uma estratégia farmacológica útil para melhorar muitos aspectos dessa condição.

GPR54: INFORMAÇÕES SOBRE A PUBERDADE DE CAMUNDONGOS E HUMANOS

Nos primeiros meses de vida, o eixo hipotálamo-pituitária-gonadal está ativo antes de ser desligado, entrando em um estágio quiescente até que seja reativado na puberdade. Existem diversas linhas de evidências sugerindo que isso seja determinado centralmente, mas os mecanismos celulares e moleculares marcantes permanecem obscuros. Estudos simultâneos recentes em camundongos e humanos têm, contudo, apresentado algumas informações: primeiro, a deleção no camundongo do gene que codifica um receptor acoplado à proteína G de função desconhecida, o Grp54, produziu animais que não mostraram nenhuma evidência de maturação sexual, mas no restante eram normais.

Em paralelo, estudos genéticos humanos em famílias consanguíneas (endogâmicas; entrecruzadas) com vários membros afetados pelo hipogonadismo hipogonadotrópico (isto é, baixo FSH, LH e esteroides sexuais), defeitos no mesmo gene (Grp54) foram descobertos, confirmando sua importância também em humanos. Os estudos sobre o mecanismo sugerem que o GRP54 esteja envolvido no hipotálamo, estimulando a produção e a liberação de GnRH. Esse passo na definição dos circuitos-centrais chaves no controle da função gonadal tem gerado atividades de pesquisa consideráveis, tanto daqueles interessados em desvendar a regulação da puberdade e da função sexual quanto daqueles interessados em explorar essa nova descoberta farmacologicamente.

Hormônio folículo-estimulante e hormônio luteinizante

Embora o FSH e o LH tenham recebidos nomes com base em suas funções na mulher, agora está claro que hormônios idênticos são secretados e funcionam nos homens

O FSH e o LH são secretados tanto no homem quanto na mulher sob a influência do GnRH, e alterações na frequência e na amplitude dos pulsos do GnRH podem influenciar as quantidades relativas de FSH e LH secretadas pelos gonadotropos. O FSH e o LH são glicoproteínas com uma subunidade α idêntica (também compartilhada com o TSH) e uma subunidade β específica. O gene para o LH sofreu recentemente aumento por duplicação para produzir o HCG, uma gonadotropina secretada por tecidos embrionários (Fig. 39.10).

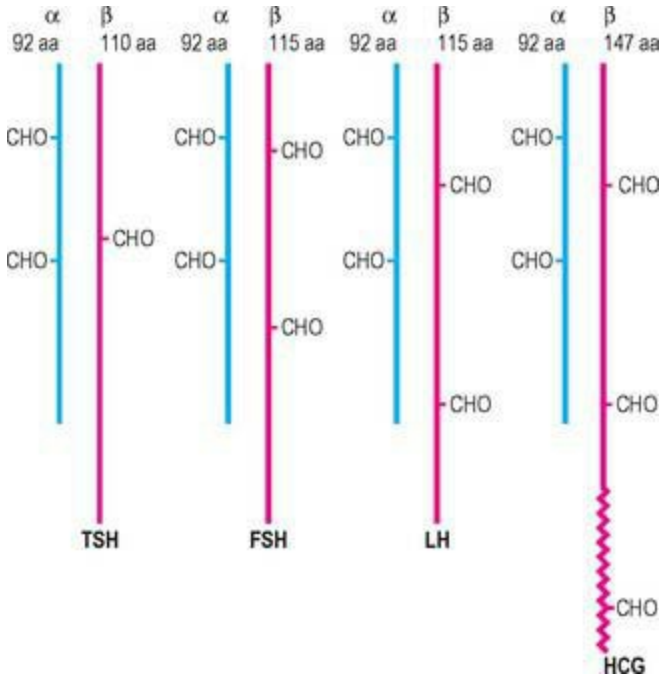


Fig. 39.10 Estruturas relativas dos hormônios glicoproteicos. Os três hormônios glicoproteicos da pituitária (TSH, FSH, LH) e a glicoproteína placentária (HCG) compartilham uma subunidade α comum. A especificidade hormonal é conferida pela subunidade β e pela estrutura proteica tridimensional resultante. CHO indica a localização aproximada das cadeias laterais de carboidratos. A HCG difere do LH somente por ter 32 aminoácidos adicionais na sua subunidade β. aa, aminoácidos.

Embora o GnRh seja essencial para o controle da secreção de FSH e LH intactos, a retroalimentação a partir do estradiol e da testosterona mais os peptídios gonadais, tais como a inibina, têm um efeito secundário. A retroalimentação pelo estradiol é especialmente interessante porque ela pode ter tanto efeitos negativos quanto positivos nas gonadotropinas, dependendo do estágio do ciclo menstrual. Um perfil do controle dos eixos hipotálamo-pituitária-gônadas, tanto para mulheres quanto homens adultos, é mostrado na Figura 39.11. A meia-vida do LH no plasma é de aproximadamente 50 minutos; o FSH tem meia-vida mais longa, de cerca de quatro horas. Tanto as concentrações de FSH quanto de LH variam consideravelmente dependendo da idade e do sexo (Fig. 39.12).

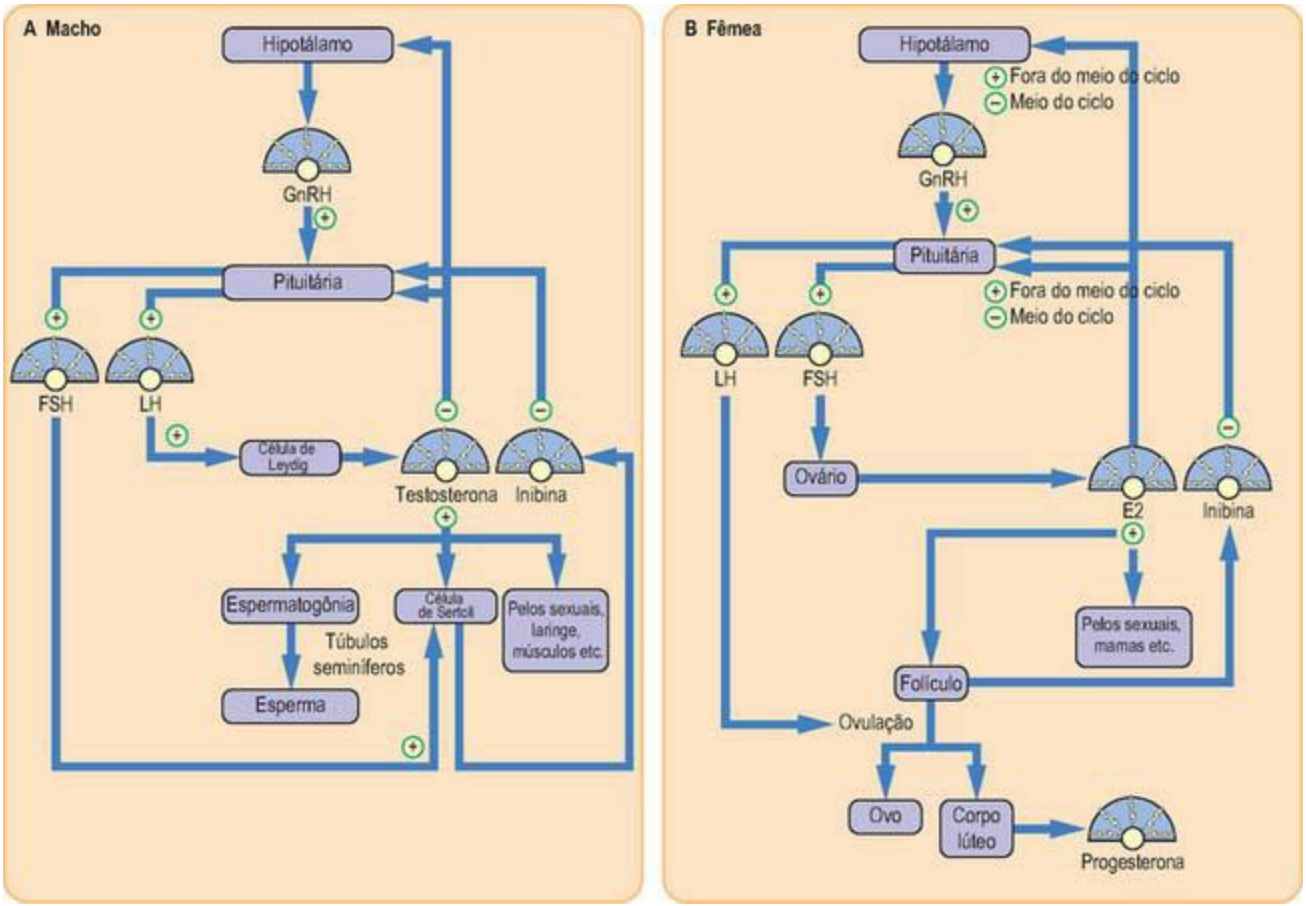


Fig. 39.11 Controle dos eixos hipotálamo-pituitária-gônadas. (A) No homem, a testosterona é produzida a partir do colesterol nas células de Leydig sob a estimulação do LH. A testosterona e o FSH dão suporte à espermatogênese. (B) Na mulher, o estradiol (E_2) é produzido pelas células granulosas e pelo folículo em desenvolvimento após a estimulação por retroalimentação. A retroalimentação pelo E_2 é principalmente negativa mas, no meio do ciclo, exerce uma retroalimentação positiva de E_2 resultando no surto de LH que causa a ovulação. A progesterona (P) é secretada pelo corpo lúteo resultante.

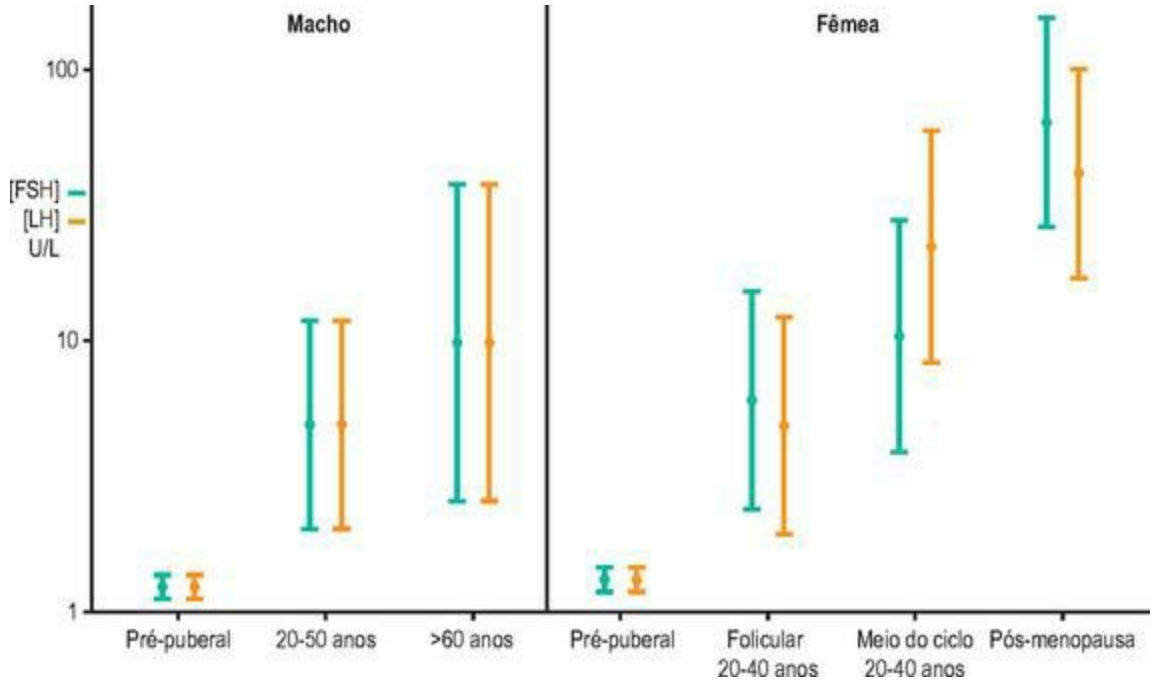


Fig. 39.12 Variações no FSH e LH no soro durante a vida. Os níveis séricos de FSH e LH variam dependendo da idade e do sexo.

CONFIRMAÇÃO BIOQUÍMICA DA GRAVIDEZ

A confirmação bioquímica de gravidez é atualmente efetuada por meio de um teste simples e sensível que fornece resultados confiáveis com duas semanas de fertilização (isto é, antes do próximo período menstrual). Os testes de gravidez podem ser feitos por médicos, enfermeiros ou até mesmo pelos próprios interessados, uma vez que são facilmente comprados em farmácias.

Os testes de gravidez são imunoensaios que avaliam a produção de gonadotropina coriônica humana (HCG). Um imunoensaio específico em sanduíche é empregado (Fig. 39.2). Um anticorpo reconhece a subunidade α do HCG enquanto o outro se liga somente a um segmento de 32 aminoácidos da subunidade β, que só existe no HCG (Fig. 39.10). Uma vez que uma mulher não grávida não produz normalmente HCG, a detecção mesmo em níveis baixos dos primeiros estágios do desenvolvimento placentário é suficiente para confirmar a gravidez.

Ações do FSH e do LH nos testículos

O FSH e o LH influenciam a espermatogênese

Nos machos, a biossíntese da testosterona ocorre nas células de Leydig dos testículos sob a influência primária do LH (Fig. 39.11) atuando através do receptor de LH acoplado à proteína G. Os altos níveis intratubulares de testosterona cooperam com o FSH na promoção da espermatogênese no túbulo espermático: o FSH se liga a seu receptor específico na célula de Sertoli dos testículos e, por um mecanismo similar ao do LH, induz o aumento da síntese de diversas proteínas, incluindo a proteína ligante de androgênios (ABP) e a inibina. A ABP é secretada no lúmen dos túbulos seminíferos, onde se liga à testosterona (ou sua forma ativa, a di-hidrotestosterona). Isso garante alta concentração local de androgênio que, juntamente com o FSH, promove as divisões meióticas que são necessárias para a espermatogênese. A inibina tem um papel na alça de retroalimentação negativa do FSH (Fig. 39.11).

Ações bioquímicas da testosterona nos homens

A testosterona não somente influencia a regulação da gonadotropina e a espermatogênese, mas também é um esteroide anabólico natural

Quase 95% da testosterona sérica é originada dos testículos; o restante se origina da glândula adrenal. Mais de 97% da testosterona circulante está ligada à proteína, com quantidades iguais ligadas à albumina e à globulina ligante específica de hormônios sexuais (SHBG), que tem uma estrutura similar à ABP. A testosterona é metabolizada nos tecidos-alvo a di-hidrotestosterona (DHT) através da redução do carbono 5-α, com mais do que o dobro da afinidade pelo receptor de androgênio nuclear. Além dos efeitos na regulação da gonadotropina e na espermatogênese, os androgênios induzem o desenvolvimento do trato reprodutivo a partir dos ductos wolffianos durante a diferenciação sexual masculina. Eles também têm efeitos anabólicos, estimulando a síntese proteica e um aumento na massa muscular (Fig. 39.13).

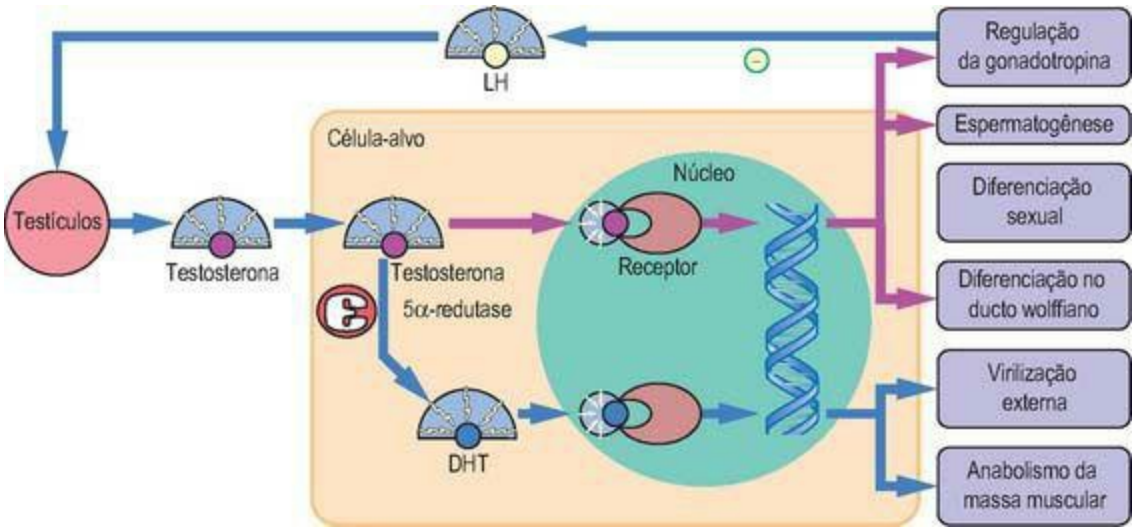


Fig. 39.13 Mecanismos de ação da testosterona. A testosterona derivada dos testículos entra na célula-alvo e se liga ao receptor de androgênio, tanto diretamente quanto após a conversão à 5α-di-hidrotestosterona (DHT). A DHT se liga mais firmemente do que a testosterona, e o complexo DHT-receptor se liga mais eficientemente à cromatina. As ações finais mediadas pela testosterona dentro da célula são mostradas pelas setas púrpuras, aquelas mediadas pela DHT são mostradas pelas setas azuis.

Distúrbios clínicos da secreção de testosterona nos homens

A deficiência de testosterona pode se originar de uma ampla faixa de distúrbios do hipotálamo, da pituitária ou dos testículos

A falência endócrina dos testículos pode ocorrer devido a trauma ou inflamação (p. ex., orquite por cachumba) ou devido à falência ao nível do hipotálamo ou da pituitária. De fato, os gonadotropos estão entre os tipos celulares da pituitária anterior, mais sensíveis ao dano dessa glândula (p. ex., devido ao crescimento de um adenoma na estrutura óssea da *sella turcica*), e, consequentemente, a falência gonadal é frequentemente a primeira manifestação da doença pituitária. Há também uma série interessante de distúrbios genéticos que se manifestam como falência gonadal: a síndrome de Klinefelter, causada pela aquisição de um cromossomo X adicional nos homens (cariótipo 47XXY), se apresenta com ginecomastia (aumento anormal do tamanho das mamas masculinas), eunucoidismo e graus variados de hipogonadismo, e é decorrente do desenvolvimento anormal dos testículos. O FSH sérico está elevado, e o LH está geralmente elevado, mas os níveis de testosterona podem ser subnormais. A síndrome de Kallmann, por outro lado, é um distúrbio genético hipotalâmico em crianças que apresentam produção deficiente de GnRH e, geralmente, ausência de olfato (anosmia) devido à migração defeituosa do neurônios produtores de GnRH (e outros) neurônios para o hipotálamo no desenvolvimento intrauterino; os indivíduos afetados apresentam puberdade atrasada e níveis plasmáticos de FSH, LH e testosterona subnormais. A deficiência de androgênio pode levar à redistribuição dos músculos e da gordura e à perda de densidade mineral óssea, e estas podem ser corrigidas, até certo grau, pela administração de androgênios (Tabela 39.6).

Tabela 39.6 Causas do hipogonadismo.

Causas do hipogonadismo		
Local do defeito	**Bioquímica**	**Causas**

Hipotálamo	Baixo GnRH* Baixos LH e FSH Baixa razão E_2/testosterona	Tumores Irradiação Distúrbios genéticos • Síndrome de Kallmann • Mutações no GPR54
Pituitária	Alto GnRH* Baixos LH e FSH Baixo E2/testosterona	Tumores Irradiação Trauma Condições inflamatórias Distúrbios genéticos • Mutações em GnRH • Mutações nos fatores de transcrição pituitários
Gônadas	Alto GnRH* Altos LH e FSH Baixa razão E2/testosterona	Irradiação Fisiológica (menopausa) Autoimunidade Infecção (p. ex., orquite da cachumba no homem) Trauma Anormalidades genéticas • Síndrome de Klinefelter (47, XXY: homem)

		• Síndromede Turner (45, X0:mulher)

* *Na clínica, o GnRH não é facilmente dosado.*

O excesso de androgênio nos homens só é visto na puberdade precoce

A puberdade precoce é uma condição rara que pode resultar de maturação antecipada do eixo hipotálamo-pituitária-gônadas normal, de mutações de ganho de função no receptor do LH ou como resultado de um tumor que está secretando tanto androgênios quanto HCG.

Ações do FSH e do LH no ovário

Na mulher, o FSH promove a síntese do estradiol levando à maturação folicular, enquanto o LH leva à ruptura do folículo e à liberação do óvulo

Na mulher madura, o gerador de pulsos do GnRH se compromete com uma ação recíproca dinâmica com as células ovarianas na manutenção do ciclo menstrual hormonalmente direcionado (Figs. 39.11 e 39.14). Os folículos primordiais na verdade começam o crescimento e a maturação, independentemente de hormônios, muitas semanas antes do início do ciclo menstrual. Somente no início do ciclo, quando eles adquiriram a capacidade de responder ao FSH, alguns poucos folículos são preservados da atresia. As concentrações crescentes do FSH estimulam a síntese de estradiol nas células granulosas através da indução da aromatase e de outras enzimas (Fig. 39.7). Com a secreção do estradiol, o FSH diminui e essa combinação desempenha um papel importante na seleção de um folículo dominante para posterior desenvolvimento, embora detalhes do mecanismo preciso ainda precisem ser totalmente estabelecidos. A maturação folicular continua sob a influência das concentrações crescentes do estradiol. O estradiol crescente, em parte devido à retroalimentação positiva no folículo dominante, faz com que a retroalimentação central negativa do estrogênio mude para uma retroalimentação positiva, iniciando o surto de secreção de LH. O LH se liga aos receptores no folículo dominante e, em sintonia com os hormônios esteroides e outros fatores como as prostaglandinas, induz o término do primeiro estágio da meiose do óvulo, a ruptura do folículo e a liberação do óvulo cerca de 36 horas depois. Nesse momento há uma queda aguda do estradiol plasmático, seguida de uma queda no LH. O folículo rompido se transforma no corpo lúteo, que secreta a progesterona e quantidades menores de estradiol, tanto para sustentar o óvulo quanto para preparar o endométrio uterino induzido pelo estrogênio para a implantação de um óvulo fertilizado (ovo) e o estabelecimento da gravidez inicial. Na ausência de fertilização, a função do corpo lúteo declina e a secreção de progesterona e de estradiol diminui. Isso causa alterações vasculares no endométrio, levando a uma involução do tecido e à menstruação. O declínio da secreção de esteroides estimula a secreção de FSH, marcando o estágio para o início do próximo ciclo.

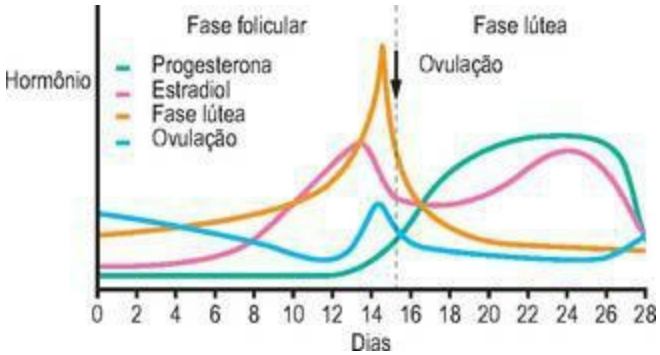


Fig. 39.14 Mudanças na secreção hormonal durante o ciclo menstrual normal. LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio folículo-estimulante.

Ações dos hormônios esteroides na mulher

Na mulher com ciclo menstrual normal, é o nível de progesterona que tem significância no diagnóstico

As concentrações de FSH, LH, estradiol e progesterona variam consideravelmente durante o ciclo menstrual. Em uma mulher com ciclo normal, a progesterona é de utilidade diagnóstica particular: uma concentração sérica de mais de 20 nmol/L na fase lútea é consistente com a ovulação (Fig. 39.14). Fora de seus papeis no ciclo menstrual e na reprodução, tanto o estradiol quanto a progesterona têm outros efeitos, atuando através de receptores nucleares específicos nas células-alvo. O estradiol, trabalhando em conjunto com outros hormônios, como o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), é responsável pelo crescimento corporal linear, pelo desenvolvimento das mamas e pela maturação do trato urogenital e a aparência geral feminina. Na vida adulta, tanto o estradiol quanto a progesterona mantêm a função das mamas, e o estradiol tem um papel importante na preservação da densidade mineral óssea. A progesterona é responsável pelo aumento na temperatura corporal basal durante a fase lútea do ciclo menstrual, e as diminuições na secreção de progesterona podem contribuir para as mudanças de humor pré-menstruais.

Distúrbios na secreção de esteroides na mulher

Assim como no homem, os distúrbios endócrinos da secreção subnormal de esteroides sexuais na mulher podem resultar de uma ampla faixa de distúrbios no hipotálamo, na pituitária ou no ovário

Assim como nos testículos, a falência endócrina dos ovários pode ocorrer devido ao dano ou à disfunção dos próprios ovários ou devido aos defeitos ao nível do hipotálamo ou da pituitária. Diversas patologias, incluindo os adenomas pituitários e a síndrome de Kallmann, são comuns ao homem e à mulher. Contudo, na mulher, o distúrbio genético mais comum que afeta os ovários é a síndrome de Turner (cariótipo 45X), que tem aspectos somáticos característicos que incluem baixa estatura, FSH e estradiol pré-puberal séricos elevados e ovários vestigiais ou "em fita". Várias outras causas endócrinas de infertilidade são mostradas na Tabela 39.6, mas estão muito além dos objetivos deste texto.

As síndromes da secreção excessiva de esteroides ovarianos levam à puberdade precoce em crianças e à infertilidade e/ou ao hirsutismo nas adultas

A puberdade precoce pode surgir a partir da maturação antecipada do eixo hipotalâmico gonadal normal, de um cisto ovariano, tumor ovariano ou da adrenal (secretores de estradiol ou androgênios), da hiperplasia adrenal congênita ou da resistência grave à insulina. Na mulher madura, a hipersecreção de androgênio na síndrome do ovário policístico (PCOS) pode resultar na infertilidade e/ou no hirsutismo. Embora a etiologia da PCOS permaneça incerta, ela mostra forte predisposição genética, e as teorias atuais sugerem um papel-chave do metabolismo intraovariano aberrante dos androgênios, em alguns casos fortemente influenciado pela resistência sistêmica à insulina. Contudo, a natureza da comunicação entre a ação da insulina e a produção ovariana de androgênios, clinicamente importante, ainda não está clara.

O EIXO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

O hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) e a somatostatina

O GHRH é um peptídeo de 44 aminoácidos sintetizado como parte de um pró-hormônio de 108 aminoácidos nos núcleos arqueado e ventromedial do hipotálamo e na eminência medial. O GHRH se liga a seu receptor nas células somatotrópicas pituitárias e induz os sistemas da adenilato ciclase e cálcio-calmodulina intracelular (Cap. 40) a estimular a transcrição e a secreção do GH a partir da pituitária anterior. A retroalimentação negativa do GH e do IGF-I resulta em diminuição na síntese e na secreção do GHRH e em aumento na síntese e na secreção da somatostatina.

A somatostatina é encontrada em duas formas, com 14 e 28 aminoácidos, ambas produzidas a partir do mesmo produto gênico de 116 aminoácidos. A somatostatina e seus receptores são encontrados por todo o cérebro e também em outros órgãos, notavelmente o intestino. A ligação da somatostatina ao seu receptor está acoplada à adenilato ciclase por uma proteína inibitória de ligação ao nucleotídeo guanina, resultando em diminuição do AMPc intracelular. No contexto do crescimento, a somatostatina inibe a secreção de GH. O GHRH e a somatostatina são liberados em surtos separados para possibilitar um nível muito fino de controle da liberação de GH. A somatostatina também inibe a produção ou a ação de muitos outros hormônios, incluindo o TSH, a insulina, o glucagon e a gastrina. Os análogos de ação longa duração da somatostatina são, portanto, efetivos no tratamento do excesso de GH, assim como de tumores que secretam uma ampla faixa de outros hormônios e como um adjunto da cirurgia pancreática para inibir as secreções exócrinas a partir de resíduos pancreáticos durante a recuperação.

A maior secreção de GH ocorre em crianças e adultos jovens, principalmente durante o sono

TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL (HRT)

As mulheres normalmente atingem a menopausa entre os 45 e os 55 anos de idade. A ausência de folículos ovarianos leva à ausência de secreção de estrogênio e de inibina, resultando em aumento marcante do FSH hipofisário. Existem sintomas vasomotores da deficiência de estrogênio (rubor) associados à menopausa. A deficiência de estrogênio pós-menopausa prolongada é conhecida por aumentar a taxa de perda óssea, levando à osteoporose, e também por alterar o metabolismo das lipoproteínas de modo a aumentar o risco de doença cardiovascular. A HRT com uma preparação de estrogênio foi prática padrão desenvolvida na maioria dos países desenvolvidos, tanto para aliviar os sintomas agudos como para fornecer profilaxia contra os riscos em longo prazo. Contudo, estudos recentes demonstraram que a HRT aumenta o risco de câncer de mama, doença cardiovascular, derrame e embolia pulmonar. Embora a HRT tenha um efeito modesto na prevenção da osteoporose, existem novas drogas, os bifosfonatos, que são de mesma eficiência. As recomendações correntes são que a HRT deva ser usada apenas como terapia em curto prazo para os sintomas vasomotores que não respondem a outros tratamentos.

Embora o GH possa existir em formas distintas, a principal espécie é uma proteína de 22 kDa. Aproximadamente dois terços do GH na circulação estão associados a uma proteína de ligação de 29 kDa que é idêntica ao domínio extracelular do receptor de GH. Essa proteína de ligação prolonga a meia-vida do GH no plasma por cerca de 20 minutos.

A pituitária humana normal contém aproximadamente 10 mg de GH; menos de 5% dele é liberado a cada dia. Essa liberação ocorre em surtos com uma periodicidade de 3-4 horas, e a maior atividade secretória ocorre durante o sono. No pico de um surto secretório, a concentração de GH plasmático pode ser 100 vezes maior do que os níveis basais; isso significa que nenhum intervalo de referência significativo pode ser escolhido para esse hormônio e, por isso, medições significativas requerem tanto um teste provocativo quanto múltiplas amostras durante o curso de um dia. Os surtos secretórios ocorrem mais frequentemente em crianças e jovens adultos.

Controle da secreção de GH

O GH tem uma ampla faixa de ações na regulação do crescimento e no metabolismo intermediário

Não é surpresa, em vista da ampla faixa de ações do GH, que diversos fatores além do GHRH e da somatostatina possam influenciar a secreção de GH. Eles incluem outros hormônios (estradiol) e metabolitos energéticos (glicose). Diversos agentes farmacológicos também são conhecidos por influenciar a secreção de GH. Esses fatores atuam em centros superiores e no hipotálamo para alterar os padrões desecreção do GHRH e da somatostatina.

As ações bioquímicas do GH

A ligação do GH ao seu receptor precipita uma série complexa de eventos intracelulares que levam à transcrição de muitas enzimas, hormônios e fatores de crescimento, incluindo o IGF-I

A diversidade da ação do GH torna difícil entender ou integrar todas as suas funções; logo, é conveniente pensar em duas fases distintas (Fig. 39.15). As ações diretas do GH são nos metabolismos dos lipídios, carboidratos e proteínas. Durante a hipoglicemia, o GH estimula a lipólise e induz a resistência periférica à insulina. Esses efeitos estimulam o uso dos ácidos graxos nos tecidos periféricos, poupando a glicose para o uso no cérebro. Antes, a terapia do GH era usada somente para o tratamento da deficiência de GH em crianças de modo a estimular o crescimento; agora, o tratamento é frequentemente estendido para a vida adulta em algumas situações em que possa melhorar a qualidade de vida. Essa mudança na estratégia de tratamento ilustra os efeitos complexos do GH no metabolismo. Durante o crescimento, o GH estimula a captação de aminoácidos e sua incorporação em proteínas, especialmente no músculo. As ações indiretas do GH são mediadas pelo IGF-I. Essas ações promovem a proliferação de condrócitos e a síntese da matriz cartilaginosa nos tecidos esqueléticos. Embora o GH seja mais frequentemente associado ao seu papel na estimulação do crescimento linear, ele claramente tem outros papéis influenciando a quantidade relativa e a distribuição de gordura e de tecido muscular. Seus efeitos anabólicos são o racional para uso ilícito atual no esporte.

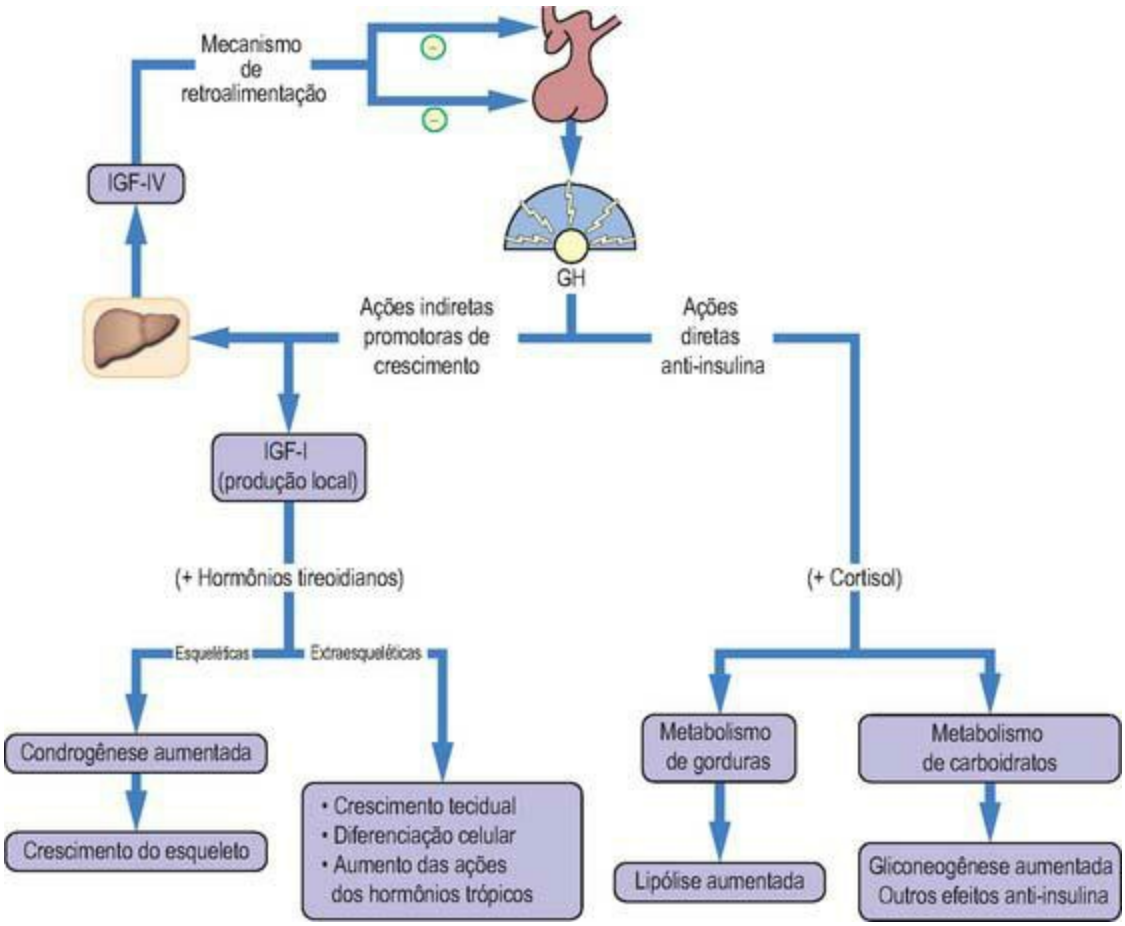


Fig. 39.15 Funções bioquímicas do hormônio do crescimento (GH). Elas podem ser divididas convenientemente em ações diretas no metabolismo de lipídios e de carboidratos e ações indiretas na síntese proteica e na proliferação celular.

Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I)

O IGF-I é o mais dependente do GH de uma série de fatores de crescimento

O IGF-I é um peptídeo básico de cadeia única com 70 aminoácidos, que tem uma homologia considerável com a pró-insulina. Em resposta aos hormônios trópicos como o GH, o IGF-I é produzido em muitos tecidos, cujo crescimento é então estimulado; ou seja, o IGF-I atua como um hormônio parácrino. O fígado é a principal fonte do IGF-I circulante, cuja função é primariamente a inibição por retroalimentação da secreção de GH. No plasma e em outros fluidos extracelulares, o IGF-I está complexado com uma série de proteínas ligantes de IGF (IGFBPs), das quais a IGFBP-III é a mais abundante. O IGF-I trabalha através do receptor de IGF tipo I (IGF-IR), o qual é estruturalmente similar ao receptor de insulina e ligado à atividade tirosina quinase intracelular. As afinidades relativas da insulina e do IGF-I por seus respectivos receptores significam que, na fisiologia normal, há uma pequena estimulação cruzada, embora em situações patológicas e farmacológicas seja possível para a insulina exercer alguma ação através do receptor de IGF-I e vice-versa. Isso tem implicações para os estados de resistência grave à insulina, nos quais a ativação local do IGFIR foi sugerida como sendo subjacente a algumas características clínicas como crescimento excessivo da pele (acantose *nigricans*). Inversamente, o IGF-I tem papel terapêutico limitado em algumas condições raras causadas pela perda da função do receptor de insulina.

O intervalo de referência do plasma para o IGF-I em adultos com idade entre 20 e 60 anos é razoavelmente constante. Ele é muito menor em crianças jovens, mas aumenta drasticamente durante o período de crescimento e progressão ao longo da puberdade. As concentrações de IGF-I diminuem após a sexta década de vida. Logo, o IGF-I parece ser um bom marcador da atividade integrada do GH.

Distúrbios clínicos da secreção de GH

A deficiência de GH em crianças é uma das diversas causas da estatura baixa, enquanto o excesso de GH em crianças leva ao gigantismo e, nos adultos, à acromegalia

A ausência de uma faixa de referência plasmática para o GH significa que a deficiência de GH só pode ser diagnosticada pelo estudo da dinâmica da secreção de GH durante o sono ou seguindo um teste de estimulação. As medições basais do IGF-I e da IGFBP-III podem servir como teste preliminar de detecção. O tratamento é por injeção regular de GH humano recombinante. Os adultos com causa clara de deficiência de GH (hipopituitarismo) também são candidatos para a terapia de reposição do GH. Uma causa genética rara da baixa estatura é o nanismo de Laron, no qual os níveis de GH estão elevados, mas os níveis de IGF-I são subnormais – um defeito no receptor do GH é o responsável.

Na maioria dos casos, o excesso de GH é causado por um tumor da pituitária

O excesso de GH é quase sempre decorrente de um tumor pituitário secretor de GH; no entanto, tumores secretores de GHRH no hipotálamo e a produção ectópica de GHRH a partir de tumores pancreáticos foram descritos. Em crianças, o excesso de GH se manifesta como gigantismo. Em adultos, as epífises dos ossos longos se fecharam e, portanto, um crescimento linear adicional não é possível. Por isso, a forma adulta, a acromegalia, é caracterizada por espessamento dos tecidos e crescimento excessivo dos ossos das mãos, pés e face (Fig. 39.16). Lábios e língua aumentados com crescimento mandibular excessivo dão origem a uma aparência facial característica. O suor excessivo e a dor nas articulações também são sintomas comuns. Infelizmente, a progressão da acromegalia é tão lenta que uma média de nove anos se passa entre o início dos sintomas e o diagnóstico. Classicamente, o diagnóstico do excesso de GH se baseava na apresentação da supressão inadequada de GH durante um teste padrão de tolerância a 75g de glicose oral e nos níveis elevados de IGF-I. Todavia, os pacientes na puberdade podem ter respostas paradoxais à glicose, e os níveis de IGF-I estão normalmente elevados durante esse estágio do desenvolvimento. Por isso, a evidência na IRM de um tumor pituitário é fundamental na realização de diagnóstico apropriado. A cirurgia é o tratamento preferido, embora a somatostatina de ação prolongada também seja efetiva. Mais recentemente, o Pegvisomant, um antagonista do GH desenvolvido racionalmente com base em características estruturais da interação hormônio-receptor, também se mostrou útil em casos refratários.



Fig. 39.16 Acromegalia.

O EIXO DA PROLACTINA

Dopamina

A dopamina é um inibidor da secreção de prolactina

A prolactina é o único dentre os hormônios pituitários que está predominantemente sob o controle inibitório do hipotálamo (Fig. 39.4). Além disso, o agente controlador é uma molécula simples, a dopamina (Cap. 42), que é produzida pelos neurônios de dopamina túbero-infundibulares. A dopamina atua estimulando os receptores D2 dos lactotropos pituitários para inibir a adenilato ciclase e, consequentemente, inibir tanto a síntese quanto a secreção da prolactina. Vários neuropeptídeos, incluindo o TRH, têm propriedades liberadoras de prolactina, mas há pouca evidência de seus papéis fisiológicos.

Prolactina

A prolactina pode auxiliar no crescimento mamário e na formação de leite em associação com outros hormônios relacionados à gravidez

A prolactina é uma proteína de 23 kDa, que é homóloga ao GH. O papel primário da prolactina em humanos ocorre durante a gravidez, quando a prolactina se liga a seu receptor no tecido mamário e estimula a síntese de diversas proteínas do leite, incluindo a lactoalbumina. Em outros animais, a prolactina também tem efeitos gonadotrópicos, imunológicos e hematológicos: ela é necessária para a manutenção da gravidez em roedores, é mitogênica para algumas células do sistema imunológico e melhora algumas formas de anemia. A prolactina exerce seus efeitos na função reprodutiva da mulher em múltiplos níveis. Suas ações incluem o bloqueio da ação do FSH na secreção folicular do estrogênio e no aumento dos níveis de progesterona pela inibição de enzimas metabolizadoras de esteroides.

Distúrbios clínicos da secreção de prolactina

Não existem síndromes conhecidas de deficiências de prolactina, mas a hiperprolactinemia é muito comum

A hiperprolactinemia pode resultar de um tumor pituitário secretor de prolactina (prolactinoma), um suprimento deficiente de dopamina do hipotálamo ou o uso de qualquer uma da grande série de drogas antidopaminérgicas. Na mulher, as características presentes da hiperprolactinemia incluem irregularidade menstrual e galactorreia (liberação de leite da mama). Prolactina sérica altamente elevada é geralmente um diagnóstico de prolactinoma. Para indivíduos com hiperprolactinemia modesta, que não estão tomando drogas antidopaminérgicas, o diagnóstico diferencial é difícil; imagens da pituitária e/ou testes dinâmicos da secreção de prolactina irão auxiliar o diagnóstico de um microprolactinoma. As opções de tratamento incluem drogas agonistas de dopamina de ação prolongada ou cirurgia. Os prolactinomas precisam ser observados com cuidado, principalmente durante a gravidez, quando há hiperplasia fisiológica dos lactotropos pituitários em antecipação à lactação.

Nos homens, a hiperprolactinemia pode causar impotência e hiperplasia prostática. Contudo, como outras condições produzem mais comumente esses sintomas, o diagnóstico da hiperprolactinemia é frequentemente ignorado até que os prolactinomas se tornem muito grandes e se apresentem como hipopituitarismo com defeitos no campo visual. Esses sintomas surgem quando o tumor se expande para fora da fossa pituitária e invade o quiasma do nervo óptico. Esses tumores frequentemente encolhem e se tornam fibrosos com a terapia agonista com dopamina. Por essa razão é muito importante identificar quais pacientes com grandes tumores pituitários têm níveis muito altos de prolactina, já que eles podem evitar a necessidade de cirurgia.

Resumo

O sistema endócrino produz hormônios, um grupo estruturalmente diverso de mensageiros químicos que regulam e coordenam o metabolismo, o crescimento, a reprodução e as respostas a estímulos externos do corpo todo. O eixo hipotálamo-pituitária anterior é uma ligação crítica entre o cérebro e as glândulas endócrinas periféricas, e processa diversos estímulos internos e externos em somente uns poucos sinais hormonais: ele controla a síntese e a ação do hormônio tireoidiano, dos glicocorticoides, dos esteroides sexuais, do hormônio do crescimento e da prolactina. O eixo hipotálamo-pituitária anterior controla a produção e a liberação da ocitocina e da AVP/ADH. A ação desses hormônios nas células é controlada pelos receptores localizados nas membranas celulares ou intracelulares. Os mecanismos de retroalimentação são importantes no controle dos sistemas endócrinos, e tanto a hiperatividade quanto a hipoatividade desses eixos produzem síndromes clínicas distintas. O diagnóstico laboratorial dos distúrbios endócrinos recai fortemente sobre a dosagem dos hormônios no sangue; no entanto, deve-se prestar atenção cuidadosa ao horário da coleta e à natureza da amostra requerida, antes que a interpretação significativa dos resultados seja possível.



MACROPROLACTINA

Embora os imunoensaios baseados em anticorpos sejam ferramentas extremamente poderosas no diagnóstico endócrino, eles estão sujeitos a interferências por anticorpos endógenos de diversas maneiras. Uma maneira pela qual os anticorpos endógenos podem produzir resultados confusos é pela ligação e agregação do hormônio-alvo em complexos de alto peso molecular (APM). Isso pode ser visto para diversos hormônios peptídicos, mas é particularmente problemático para a prolactina, sendo que a conhecida "macroprolactina" pode ser responsável por mais de 10% dos casos de prolactina sérica aparentemente elevada. É um problema, já que a macroprolactina geralmente não é biologicamente ativa e por isso sua detecção pode levar a um tratamento desnecessário. Existem diversos modos de contornar isso. Mais simplesmente, como os diferentes imunoensaios frequentemente têm diferentes capacidades de detectar a macroprolactina, o uso de mais de um ensaio pode fornecer uma forte pista de sua presença. Segundo, uma técnica comum é precipitar os complexos APM com polietileno glicol (PEG) com os imunoensaios sendo feitos antes e após essa precipitação para estabelecer o desconto de quanto sinal é perdido na fração APM. Uma quantificação mais precisa pode requerer técnicas trabalhosas como a filtração em gel.

O corpo humano contém diversos outros sistemas endócrinos não considerados neste capítulo, embora eles sejam governados pelos mesmos princípios gerais. Alguns desses sistemas são considerados em outros capítulos como parte da função fisiológica que eles controlam. Assim, o leitor é referido ao capítulo 21 para a homeostase dos carboidratos, ao capítulo 25 para a homeostase do cálcio e ao capítulo 23 para a homeostase da água e dos eletrólitos, e o controle da pressão sanguínea. Os sistemas de sinalização intracelulares através dos quais os hormônios exercem seus efeitos são descritos no próximo capítulo.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Trace um fluxo de mão dupla de informação entre o hipotálamo e os folículos ovarianos no início do ciclo menstrual.

2. Como o GH, o cortisol e a insulina interagem para regular o metabolismo lipídico e de carboidratos?

3. Como o iodo da dieta varia muito, os hormônios tireoidianos precisam ser sintetizados e armazenados quando o iodo está disponível, mas os hormônios tireoidianos são hidrofóbicos e não podem ser contidos dentro de vesículas de membrana. Como a glândula tireoide resolve esse problema?

Leituras sugeridas

Anderson MS. Autoimmune endocrine disease. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:760-764.

Cooper DS. Hyperthyroidism. *Lancet*. 2003;363:459-468.

Dattani M, Preece M. Growth hormone deficiency and related disorders: insights into causation, diagnosis and treatment. *Lancet*. 2004;363:1977-1987.

Dayan CM. Interpretation of thyroid function tests. *Lancet*. 2001;357:619-624.

Henderson J. Ernest Starling and 'hormones': an historical commentary. *J Endocrinol*. 2005;184:5-10.

Melmed S. Acromegaly. *N Engl J Med*. 2006;355:2558-2573.

Newell Price J, Bertagna X, Grossman A, Nieman L. Cushing's syndrome. *Lancet*. 2006;367:1605-1617.

Roberts CGP, Ladenson PW. Hypothyroidism. *Lancet*. 2004;362:793-803.

Schlechte JA. Prolactinoma. *N Eng J Med*. 2003;349:2035-2041.

Schneider HJ, Aimaretti G, Kreitschmann-Andermahr I, et al. Hypopituitarism. *Lancet*. 2007;369:1461-1470.

Zimmermann MB, Jooste PL, Pandav CS. Iodine-deficiency disorders. *Lancet*. 2008;372:1152-1168.

Sites

www.endo-society.org www.endo-society.org

www.endotext.org www.endotext.org

www.thyroidmanager.org www.thyroidmanager.org

www.pituitary.org www.pituitary.org

www.CSRF.net www.CSRF.net

www.endocrine.niddk.nih.gov/www.endocrine.niddk.nih.gov/ (e.g. www.endocrine.niddk.nih.gov/pubs/cushings/cushings.htm)

Receptores de Membrana e Transdução de Sinal

M.M. Harnett, H.S. Goodridge

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Distinguir entre hormônios esteroides e polipeptídeos e descrever seus mecanismos de ação.
- Descrever os receptores acoplados à proteína G.
- Descrever a ativação das cascatas de sinalização intracelulares pelas proteínas G heterotriméricas.
- Discutir a formação dos segundos mensageiros, tais como o AMP cíclico, o trifosfato de inositol (IP3), o diacilglicerol (DAG) e o Ca2+, além de explicar como eles ativam as proteínas quinases dependentes deles.
- Explicar como as fosfolipases formam uma diversidade de segundos mensageiros lipídicos.
- Discutir como a formação de uma variedade de segundos mensageiros pode amplificar os sinais dos hormônios e gerar respostas biológicas específicas.

INTRODUÇÃO

As células percebem, respondem e integram uma multiplicidade de sinais de seu ambiente. Apesar de alguns desses sinais poderem ser mediados pelo contato célula-célula, nos organismos multicelulares diversas moléculas sinalizadoras, como os hormônios, se originam em órgãos diferentes dos seus sítios de ação e podem ser levadas pelo sangue para suas células-alvo efetoras. Da mesma forma, as células do sistema imunológico, como os fagócitos, são recrutadas do sangue para os sítios inflamatórios por meio de moléculas quimiotáticas. Os sinais gerados nessas vias são percebidos e processados por elementos de transdução de sinal celular que são formados por receptores de superfície da membrana específicos, elementos de sinalização efetora e por proteínas regulatórias. Esses elementos de sinalização servem para detectar, amplificar e integrar diversos sinais externos para gerar a resposta celular apropriada (Fig. 40.1).

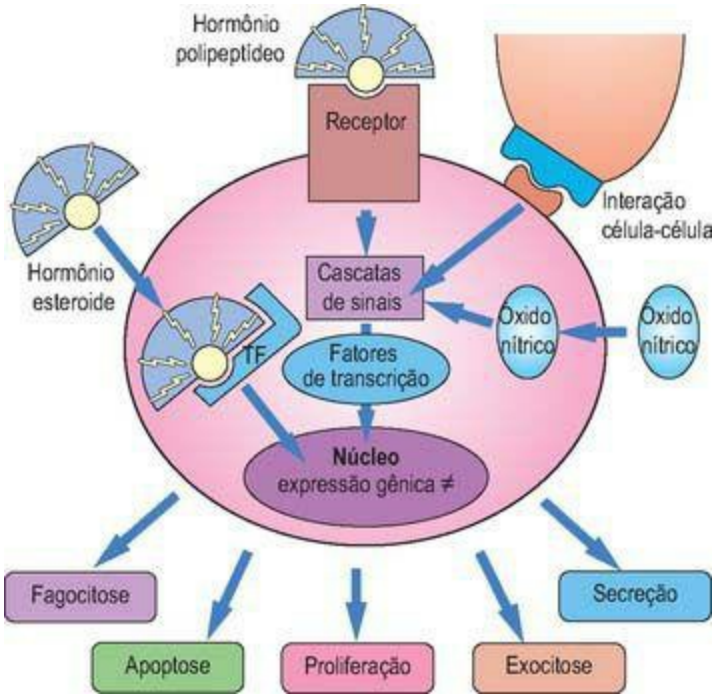


Fig. 40.1 Mecanismos de sinalização celular. NO, óxido nítrico; TF, fator de transcrição.

Neste capítulo, discutiremos primeiro como os receptores de superfície celular percebem e transduzem sinais hormonais específicos por meio do acoplamento transmembrana a sistemas enzimáticos efetores, gerando moléculas de baixo peso molecular, chamados de segundos mensageiros. Discutiremos então a diversidade desses segundos mensageiros e como eles influenciam a atividade de diversas proteínas quinases-chave com diferentes substratos que, em última instância, determinam o tipo de resposta biológica obtida.

RECEPTORES DE HORMÔNIOS

Os hormônios são mensageiros bioquímicos que atuam na orquestração das respostas de diferentes células dentro de um organismo (Cap. 39). Em geral, eles são sintetizados por tecidos específicos e secretados diretamente no sangue, que os transporta para seus respectivos órgãos-alvo. Os hormônios podem ser subdivididos, de modo geral, em duas principais classes:

- hormônios esteroides
- hormônos polipeptídeos

Esses hormônios exercem seus efeitos biológicos por meio da interação com receptores específicos, induzindo as cascatas de transdução de sinal (Tabela 40.1).

Tabela 40.1 Classificação dos receptores de membrana.

Classe do receptor	Domínios transmembrana	Atividade catalítica intrínseca	Moléculas regulatórias/ acoplamento acessório	Exemplos de subclasses de receptoras
Receptores acoplados à proteína G (receptores serpentina)	múltiplas passagens (sete α-hélices transmembrana)	nenhuma	proteínas G	β-adrenérgico α-adrenérgico muscarínico quimiocinas (IL-8) rodopsina (visão)
Receptores de canais iônicos (receptores regulados por ligantes)	múltiplas passagens; geralmente formam complexos multiméricos	nenhuma	nenhuma	neurotransmissores íons nucleotídeos inositol trifosfato (IP_3)
Receptor intrínseco de tirosina quinase	passagem única no domínio transmembrana, mas pode ser multimérico (p. ex., receptor de insulina)	tirosina quinase	nenhuma	fator de crescimento epidérmico (EGF) fator de crescimento de nervo (NGF) fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) fator de crescimento dos fibroblasto (FGF) insulina
Receptores associados à tirosina quinase	passagem única no domínio transmembrana, mas geralmente formam receptores multiméricos	nenhuma	alguns necessitam de proteínas contendo ITAM/ITIM	receptores de antígenos (quinases relacionadas à ITAM-Src) $Fc\gamma R$ (quinases relacionadas à ITIM-Src) receptores para citocina hemopoietina (Janus quinase)
Receptores intrínsecos de tirosina fosfatase	passagem única no domínio transmembrana	tirosina fosfatase	nenhuma	receptor CD45 fosfatase
Receptores intrínsecos de serina-treonina quinase	passagem única no domínio transmembrana	serina-treonina quinase	nenhuma	fator de crescimento tumoral-β (TGF-β)
Receptores intrínsecos de guanilato ciclase	passagem única no domínio transmembrana	guanilato ciclase (gera cGMP)	nenhuma	receptores do peptídeo natriurético atrial (PNA)
Receptores de domínio de morte	passagem única no domínio transmembrana	nenhuma	proteínas acessórias do domínio de morte (TRADD, FADD, RIP, TRAFs)	fator de necrose tumoral (TNF-α) Fas

cGMP, monofosfato de guanosina cíclica; FADD, proteína acessória do "domínio de morte"; FcγR, receptor para Fc-γ (receptor para imunoglobulina G); IL, interleucina; ITAM/ITIM, domínio de ativação/inibição do imunorreceptor tipo tirosina; RIP, proteína de interação com o receptor; Src, proteína tirosina quinase tipo Src; TRADD, domínio de morte associado ao receptor TNF; TRAFs, fatores associados ao receptor TNF.

Receptores intracelulares: receptores de hormônios esteroides

Os hormônios esteroides atravessam as membranas celulares

Em função de a natureza de sua estrutura ser derivada do colesterol, os hormônios esteroides, como o cortisol (produzido no córtex da glândula adrenal), os hormônios sexuais e a vitamina D podem atravessar a membrana plasmática das células para iniciar as respostas por meio de receptores localizados citoplasmaticamente, chamados de receptores de hormônios esteroides (Fig. 40.1). Esses receptores fazem parte de uma superfamília de receptores citoplasmáticos chamada de superfamília de receptor intracelular, que também transduzem sinais de outras pequenas moléculas de sinalização hidrofóbicas, como os hormônios tireoidianos derivados da tirosina (p. ex., tiroxina) e os retinoides derivados da vitamina A (p. ex., ácido retinoico).

Os receptores intracelulares para esteroides e os hormônios tireoidianos e retinoides são fatores de transcrição

Os receptores intracelulares desses hormônios esteroides e retinoides são fatores de transcrição; eles se ligam a regiões regulatórias do DNA de genes que são responsivos ao hormônio esteroide/tireoidiano em particular. Tal "ligação do ligante" (ligação) induz uma alteração conformacional no fator de transcrição que permite a ativação ou a repressão da indução gênica. Apesar de todas as células-alvo possuírem receptores específicos para hormônios individuais, elas expressam combinações distintas de proteínas regulatórias específicas para o tipo celular, que cooperam com o receptor intracelular do hormônio, de forma a determinar o repertório preciso dos genes a serem induzidos. Por essa razão, os hormônios induzem perfis de resposta distintos em diferentes células-alvo (compare com o capítulo 34).

Receptores de superfície celular: receptores de hormônios polipeptídeos

Os hormônios polipeptídeos atuam por meio de receptores de membrana

Em contraste aos hormônios esteroides, os hormônios polipeptídeos não atravessam as membranas celulares e devem iniciar seus efeitos em suas células-alvo por meio de receptores específicos na superfície celular (Fig. 40.1). Como eles próprios não entram na célula-alvo, são chamados de "primeiros mensageiros", e seus efeitos intracelulares são mediados por moléculas de sinalização de baixo peso molecular, como o monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) ou o cálcio, os quais são chamados de "segundos mensageiros". De fato, o termo "hormônios polipeptídeos" compreende uma vasta gama de famílias de hormônios, fatores de crescimento e citocinas que utilizam elementos de transdução de sinal tansmembrana para elicitar seus efeitos biológicos.

Mecanismos de sinalização independentes de receptor

Algumas moléculas de sinalização de baixo peso molecular atravessam a membrana celular

Apesar de a maior parte dos sinais extracelulares exercer seus efeitos por meio da ligação a receptores da superfície celular ou citoplasmáticos, algumas moléculas de sinalização de baixo peso molecular são capazes de atravessar a membrana e modular diretamente a atividade dos domínios catalíticos dos receptores transmembrana ou enzimas que fazem a transdução de sinal citoplasmático (Fig. 40.1). Por exemplo, o óxido nítrico (NO), que foi postulado ter uma variedade de funções, incluindo a sinalização do relaxamento das células do músculo liso dos vasos sanguíneos, pode estimular a guanilato ciclase, levando à geração do segundo mensageiro, cGMP. Os pacientes com angina são tratados com nitroglicerina, que é convertida a NO, resultando no relaxamento dos vasos sanguíneos. A consequente melhora no fornecimento de oxigênio ao músculo cardíaco alivia a dor que foi causada pelo fluxo sanguíneo inadequado para o coração (quadro da pág. 76).

RECEPTOR ACOPLADO À TRANSDUÇÃO DE SINAL INTRACELULAR

Alguns sistemas sensoriais utilizam receptor acoplado à sinalização

Além dos receptores de hormônios, os sistemas sensoriais, como a visão (Cap. 41, Fig. 41.4), o paladar e o olfato utilizam mecanismos semelhantes de transdução de sinal acoplada ao receptor de superfície da membrana (Tabela 40.1). Alguns desses receptores, por exemplo os receptores β-adrenérgicos ou os receptores de antígenos em linfócitos, não possuem atividade catalítica intrínseca e servem simplesmente como unidades de reconhecimento específicas. Esses receptores utilizam uma variedade de mecanismos, incluindo moléculas adaptadoras ou moléculas regulatórias cataliticamente ativas, como as proteínas G (guanosina trifosfatases, GTPases, as quais hidrolisam o GTP) para se acoplarem aos seus elementos de sinalização efetores, os quais são em geral enzimas (com frequência chamadas de enzimas de sinalização ou transdutoras de sinal) ou canais iônicos (Fig. 40.2). Em contraste, outros receptores – como os receptores intrínsecos de tirosina quinase para fatores de crescimento (p. ex., o fator de crescimento derivado de plaquetas, PDGF) ou os receptores intrínsecos de serina quinase para moléculas como o fator β de transformação do crescimento (TGF-β) – possuem domínios extracelulares para a ligação de ligantes e domínios catalíticos citoplasmáticos. Assim, após a interação receptor-ligante (ligação ao receptor), esses receptores podem iniciar diretamente suas cascatas de sinalização pela fosforilação e modulação das atividades de moléculas-alvo da transdução de sinal (enzimas de sinalização *downstream*) que, por sua vez, propagam o sinal do fator de crescimento pela modulação da atividade de novos transdutores de sinal específicos ou de fatores de transcrição, levando à indução gênica (Caps. 34 e 43).

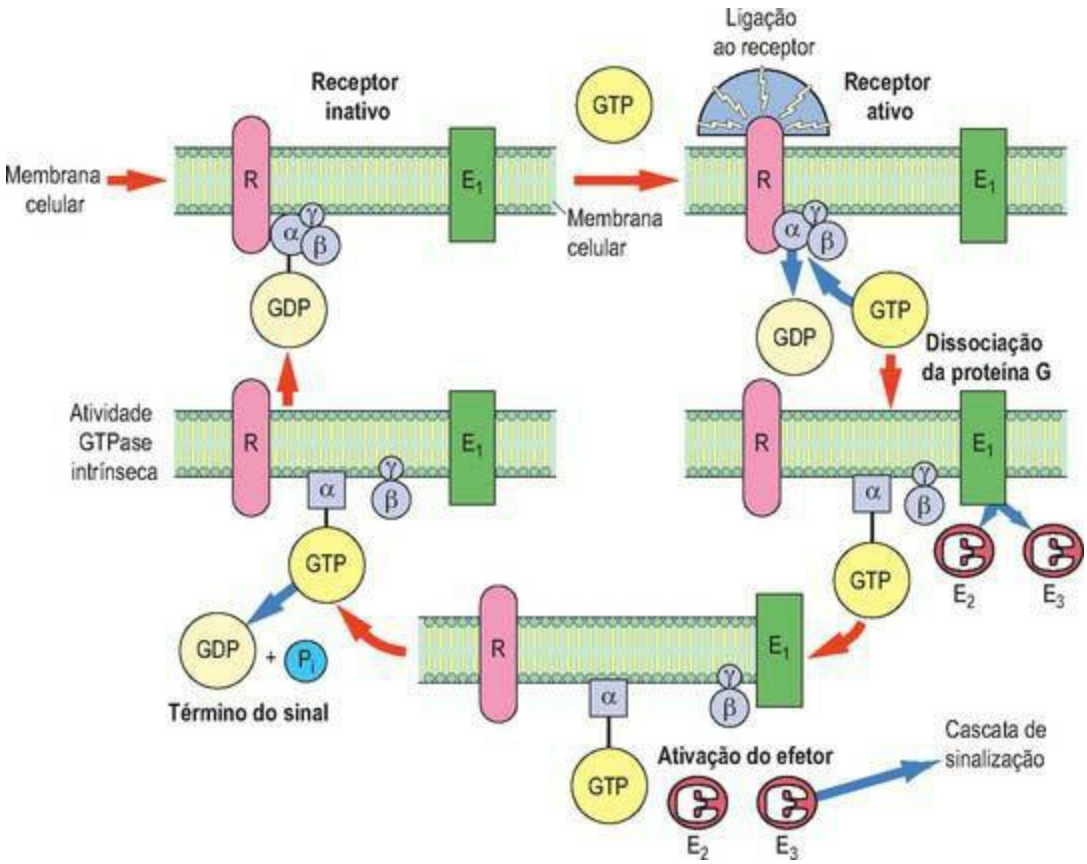


Fig. 40.2 Mecanismo de sinalização da proteína G. No estado inativo, as proteínas G estão na forma heterotrimérica com GDP ligado fortemente à subunidade α. Nenhuma das subunidades é uma proteína integral de membrana, entretanto a proteína G está ancorada à membrana plasmática pela modificação lipídica das subunidades γ (prenilação) e de algumas das subunidades α (miristoilação da família $G_{i\alpha}$). A ligação do receptor (R) leva à troca de GDP por GTP e induz à alteração da conformação em Gα, que leva a uma diminuição em sua afinidade, tanto para o receptor quanto para as subunidades βγ, levando à dissociação do complexo receptor-proteína G. A Gα ativada (ligada ao GTP) ou a liberação das subunidades βγ, ou ambas, podem então interagir com um ou mais efetores, para formar segundos mensageiros intracelulares que ativam as cascatas de sinalização *downstream*. A sinalização é terminada pela atividade GTPase intrínseca da subunidade α, que hidrolisa o GTP em GDP, permitindo a reassociação da proteína G heterotrimérica inativa Gαβγ (Fig. 41.4).

Receptores acoplados à proteína G

Os receptores acoplados à proteína G fazem parte de uma superfamília de receptores relacionados estruturalmente para hormônios, neurotransmissores, moduladores inflamatórios, proteinases, moléculas do paladar e do olfato e fótons de luz. Um exemplo clássico dessa classe de receptores é o receptor β-adrenérgico (para qual o ligante é a epinefrina), uma vez que as propriedades de sua estrutura-função foram extensamente estudadas em relação à sua ativação de cascatas de transdução de sinal. Os receptores acoplados à proteína G são proteínas integrais da membrana caracterizadas por sete hélices transmembrana em sua estrutura. Em geral eles são constituídos de uma porção *N*-terminal extracelular, sete α-hélices transmembrana (20-28 aminoácidos hidrofóbicos cada), três alças extra e intracelulares e uma cauda *C*-terminal intracelular. Os ligantes, tais como a epinefrina, normalmente se ligam ao receptor acoplado à proteína G, alojando-se um uma bolsa formada pelas sete hélices transmembrana (Fig. 13.5). Os receptores acoplados à proteína G não possuem domínios catalíticos intrínsecos. Por outro lado, eles recrutam proteínas que se ligam ao nucleotídeo guanina (proteínas G), por meio de sua terceira alça citoplasmática, para se acoplarem aos seus elementos de transdução de sinal.

Proteínas G

As proteínas G fazem parte de um grupo de moléculas regulatórias que estão envolvidas com a regulação de diversos tipos de processos biológicos, incluindo a transdução de sinal, a síntese proteica, o tráfego intracelular (liberação direcionada à membrana plasmática ou à s organelas intracelulares) e exocitose, assim como movimentação celular, crescimento, proliferação e diferenciação. A superfamília das proteínas G compreende predominantemente duas principais subfamílias: as pequenas proteínas G monoméricas do tipo *Ras* (Cap. 43) e as proteínas G heterotriméricas. As proteínas G heterotriméricas regulam a transdução dos sinais transmembrana a partir de receptores de superfície para uma variedade de efetores intracelulares, como a adenilato ciclase, a fosfolipase C (PLC), a fosfodiesterase dependente de cGMP (PDE) e sistemas efetores de canal iônico (Fig. 40.2). Essas proteínas G consistem em três classes distintas de subunidades: α (39-46 kDa), β (37 kDa) e γ (8 kDa). Em geral, a especificidade do efetor é conferida pela subunidade α, que contém um sítio de ligação para GTP e uma atividade GTPase intrínseca. Entretanto, atualmente é amplamente aceito que o complexo βγ também pode regular diretamente efetores, como a fosfolipase A_2 (PLA_2), as isoformas PLC-β, a adenilato ciclase e canais iônicos nos sistemas de mamíferos, assim como respostas celulares, como as vias do receptor de pareamento nas leveduras. Com base na homologia e função do cDNA, foram identificadas quatro principais subfamílias de genes de subunidades α: G_s, G_i, G_q e G_{12} (Tabela 40.2). Foi demonstrado que muitas dessas subunidades de Gα exibem um padrão relativamente ubíquo de expressão nos sistemas de mamíferos, pelo menos em relação aos níveis de mRNA, porém também está claro que determinadas subunidades α possuem um perfil de expressão restrito para os tecidos. Mais ainda, existem evidências de uma expressão diferencial das subunidades α durante o desenvolvimento celular.

Tabela 40.2 Propriedades das quatro principals classes de subunidades α das proteínas G de mamíferos. Algumas proteinas G podem ser caracterizadas utilizando-se diferentes substrates de toxinas bacterianas.

Subfamília de proteína G	Subunidades-α	Massa molecular (kDa)	Toxina substrato	Distribuição tecidual	Função
G_i	G_z	41	nenhuma	cérebro, medula adrenal, plaquetas	inibe a adenilil ciclase
	G_i	40	toxina *pertussis*	praticamente onipresente	as subunidades α de G_i
	G_o	40	toxina *pertussis*	cérebro, sistemas neurais	ativam a PLC e a PLA_2, bem como os canais de K^+ e inibem a adenilil ciclase e os canais de Ca^{2+}
G_s	G_t	40	toxina *pertussis*/colérica	bastonetes e cones da retina	ativa a fosfodiesterase de cGMP
	G_{olf}	40	toxina *pertussis*	botões de degustação	ativa a fosfodiesterase
	G_s	44–46	toxina colérica	onipresente	a G_s ativa a adenilil ciclase e os canais de Ca^{2+}
G_{12}	G_{olf}	45	toxina colérica	neuroepitélio olfatório	ativa a adenilil ciclase
	G_{12}	44	nenhuma	onipresente	as subunidades $G_{12/13}$ regulam
	G_{13}	44	nenhuma	onipresente	a troca Na^+/K^+, os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e a sinalização eicosanoide
G_q	G_q	42	nenhuma	praticamente onipresente	PLC
	G_{11}	42	nenhuma	praticamente onipresente	
	G_{14}	42	nenhuma	pulmão, rim, fígado, baço, testículos	
	G_{15}	42	nenhuma	células hematopoiéticas	
	G_{16}	42	nenhuma	células hematopoiéticas	

PDE, fosfodiesterase; cGMP, monofosfato de guanosina cíclica (GMPc); PLC, fosfolipase C; PLA_2, fosfolipase A_2.

Proteínas G atuam como interruptores moleculares

As proteínas G heterotriméricas regulam os sinais transmembrana por atuarem como interruptores moleculares, fazendo a ligação dos receptores acoplados à proteína G na superfície da célula a uma ou mais moléculas da cascata de sinalização *down-stream* (Fig. 40.2).

A ligação do receptor inicia uma interação com a proteína G heterotrimérica inativa ligada à GDP. Essa interação leva à troca de GDP por GTP, induzindo uma alteração conformacional em Gα, que resulta na diminuição de sua afinidade tanto para o receptor quanto para as subunidades βγ, levando à dissociação do complexo receptor-proteína G. A Gα ativada (ligada à GTP) ou as subunidades βγ liberadas, ou ambas, podem então interagir com um ou mais efetores para gerar segundos mensageiros intracelulares, que ativam a cascata de sinalização *downstream*. A sinalização é terminada pela atividade GTPase intrínseca da subunidade α, que hidrolisa GTP em GDP permitindo a reassociação da proteína G heterotrimérica inativa (Gαβγ).

SEGUNDOS MENSAGEIROS

Os receptores β-adrenérgicos são acoplados ao cAMP



AS TOXINAS BACTERIANAS QUE TÊM AS PROTEÍNAS G COMO ALVO CAUSAM UMA VARIEDADE DE DOENÇAS

Uma variedade de toxinas bacterianas exerce seus efeitos tóxicos por modificarem covalentemente as proteínas G e, assim, modularem de forma irreversível sua função. Por exemplo, a toxina colérica (colerogênica) do *Vibrio cholerae* contém uma enzima (a subunidade A) que catalisa a transferência de ADP-ribose do NAD intracelular para a subunidade α da G_s. Essa modificação impede a hidrólise do GTP ligado à G_s, levando a uma forma constitutivamente (permanentemente) ativa da proteína G. O aumento prolongado das concentrações de cAMP resultante nas células do epitélio intestinal leva à fosforilação de canais de Cl^- mediada por fosfoquinases A, causando um grande efluxo de eletrólitos e de água para o interior do intestino, que é responsável pela diarreia grave característica da cólera. A ação da enterotoxina é iniciada pela ligação específica das subunidades B (ligante) do colerágeno (AB_5) ao domínio oligossacarídeo do monossialogangliosídeo, GM_1, nas células epiteliais. Um mecanismo molecular semelhante foi atribuído à ação da enterotoxina termolábil, toxina lábil, secretada por diversas cepas de *Escherichia coli* responsáveis pela "diarreia do viajante". Em contraste, a toxina *pertussis* (outra toxina AB_5) da *Bordetella pertussis*, o agente causador da coqueluche, catalisa a ADP-ribosilação da G_i, que impede que a G_i interaja com os receptores ativados. Assim, a proteína G é inativada e não consegue inibir a adenilil ciclase, ativar a PLA_2 ou a PLC, abrir os canais de K^+ ou abrir ou fechar os canais de Ca^{2+}, causando o desacoplamento generalizado dos receptores de hormônios de suas cascatas de sinalização.

Os receptores β-adrenérgicos são acoplados para formar o segundo mensageiro, o cAMP. O hormônio β-adrenérgico epinefrina induz a degradação do glicogênio em glicose no músculo e, em menor grau, no fígado. A degradação do glicogênio no fígado é predominantemente estimulada pelo hormônio polipeptídico glucagon, o qual é secretado pelo pâncreas quando o nível de açúcar saguíneo encontra-se baixo (Caps. 13 e 21). Um dos eventos de sinalização mais precoces após a ligação desses hormônios aos seus respectivos receptores é a formação de cAMP, uma molécula pequena que possui uma função-chave na regulação da transdução de sinal intracelular, levando à conversão de glicogênio em glicose. O cAMP é derivado do ATP pela ação catalítica da enzima de sinalização adenilato ciclase (Fig. 40.3). A reação de ciclização envolve o ataque intramolecular de um grupo 3′-OH da unidade ribose do grupo α-fosforil do ATP para formar a ligação fosfodiéster, que é induzida pela subsequente hidrólise do pirofosfato liberado. A atividade do cAMP é terminada pela sua hidrólise a 5′-AMP pelas fosfodiesterases dependentes de cAMP. A importância do cAMP na regulação da degradação do glicogênio foi demonstrada por uma série de experimentos que mostraram não só que os hormônios que ativam a atividade da adenilato ciclase nas células adiposas também estimulam a degradação do glicogênio, mas também que os análogos de cAMP, que são

permeáveis à s células, como o dibutiril cAMP, podem mimetizar os efeitos desses hormônios na indução da degradação do glicogênio.

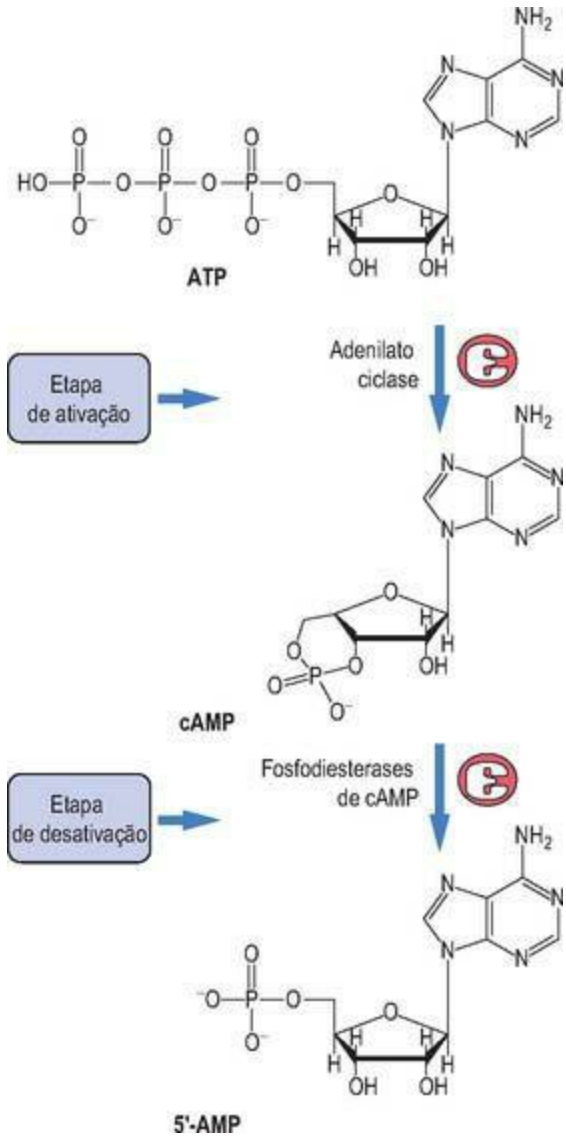


Fig. 40.3 O metabolismo do AMP cíclico. A adenilato ciclase catalisa a reação de ciclização para produzir o cAMP ativo, que é então desativado pela fosfodiesterase de cAMP. cAMP, monofosfato de adenosina cíclica.

A adenilato ciclase é ativada pela proteína G

O receptor β-adrenérgico é acoplado à ativação da adenilato ciclase pela ação da subunidade α da proteína G estimulatória, chamada de G_s. Como cada molécula de hormônio ligado pode estimular muitas subunidades α de G_s, essa forma de sinalização transmembrana amplifica o sinal original do hormônio. Apesar de a hidrólise do GTP pela GTPase intrínseca da subunidade α de G_s atuar de forma a encerrar a ativação da adenilato ciclase, o complexo hormônio-receptor também deve ser desativado para que a célula volte ao seu estado de repouso não estimulado. Essa dessensibilização do receptor, que ocorre após a exposição prolongada ao hormônio, envolve fosforilação da cauda *C*-terminal do receptor β-adrenérgico ocupado pelo hormônio, por uma quinase conhecida como quinase do receptor β-adrenérgico. Os receptores acoplados à proteína G, como os receptores α-adrenérgicos, que atuam inibindo a geração de cAMP, estão acoplados à inibição da adenilato ciclase por meio da proteína G do tipo G_i.

A proteína quinase A se liga no cAMP e fosforila outras enzimas

O cAMP faz a transdução de seus efeitos na interconversão do glicogênio-glicose, por meio da regulação de uma enzima-chave de sinalização, a proteína quinase A (PKA), que fosforila proteínas-alvo em resíduos de serina e treonina. A PKA é uma enzima multimérica que contém duas subunidades regulatórias (R) e duas catalíticas (C): a forma tetramérica R_2C_2 da PKA é inativa, porém a ligação de quatro moléculas de cAMP à s subunidades R leva à liberação das subunidades C cataliticamente ativas, que podem então fosforilar e modular a atividade de duas enzimas-chave, fosforilase quinase e glicogênio sintase (Fig. 40.4), as quais estão envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio (Cap. 13). O envolvimento de uma cascata de transdução de sinal com tantas etapas leva a uma importante amplificação do sinal original em cada estágio da cascata, garantindo que a ligação de somente algumas moléculas de hormônio leve à liberação de grande número de moléculas de açúcar. A amplificação de um sinal hormonal envolvendo as proteínas G, a adenilato ciclase, a proteína quinase A e a fosforilase está ilustrada na Figura 40.5 (compare com a Figura 13.4).

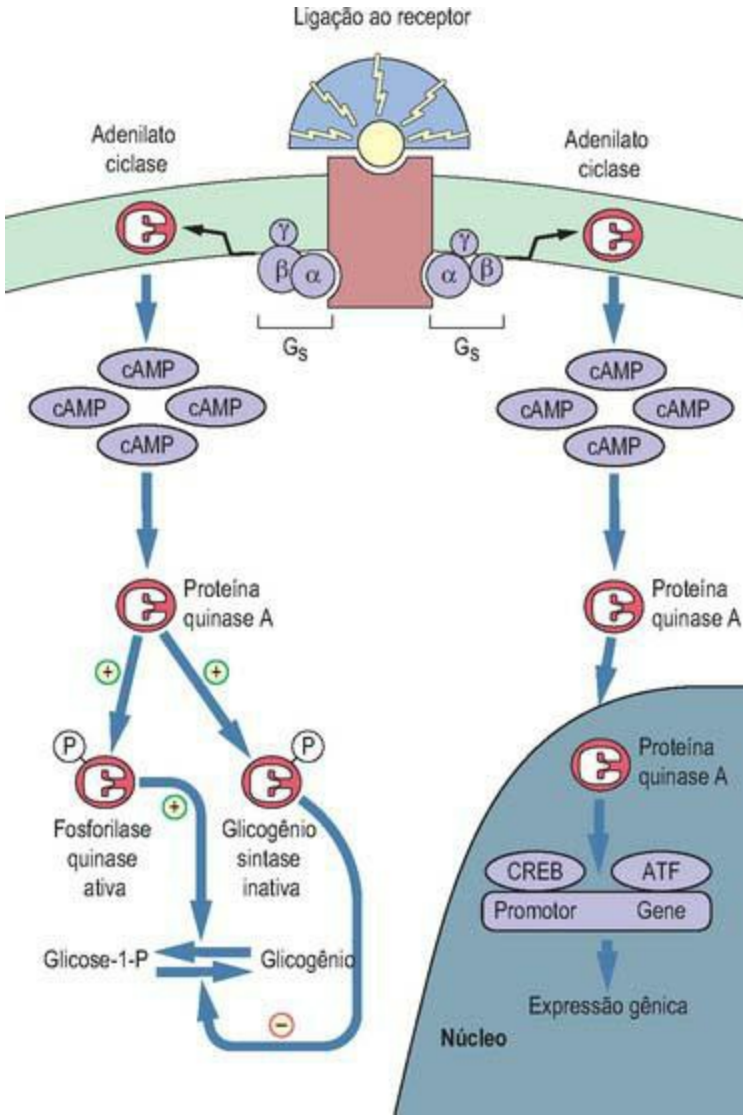


Fig. 40.4 A proteína quinase A (PKA) atua como uma enzima de sinalização para o segundo mensageiro cAMP. A ligação de uma proteína G estimulatória (G_s) ao complexo hormônio-receptor ativa a adenilato ciclase, que catalisa a produção de cAMP. A

proteína quinase A é ativada pela ligação de quatro moléculas de cAMP. A tanslocação da PKA para o núcleo modula a atividade de fatores de transcrição, por exemplo, CREB e ATF (consulte o texto), levando à indução ou repressão da expressão gênica (compare com a Figura 13.6).

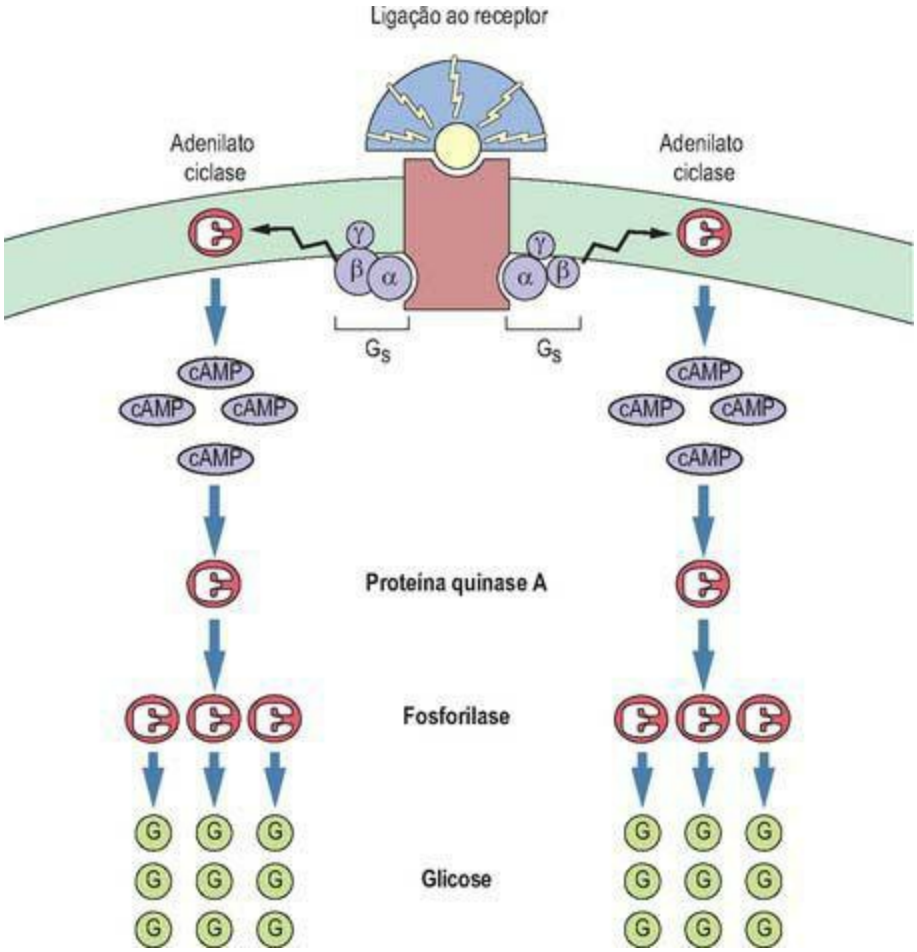


Fig. 40.5 A cascata de sinalização induz a amplificação do sinal do hormônio. Cada complexo hormônio-receptor ativado pode estimular múltiplas moléculas de G_s. Cada adenilato ciclase pode catalisar a formação de muitas moléculas de cAMP e cada proteína quinase A pode ativar muitas moléculas de fosforilase, levando a uma liberação de grande quantidade de moléculas de glicose (G), como resultado da degradação de glicogênio (compare com a Figura 13.4).

Muitas outras respostas celulares podem ser mediadas pelos elementos de sinalização cAMP-PKA

A fosforilação mediada pela PKA pode regular a atividade de diversos canais iônicos, como os canais de K^+, Cl^- e Ca^{2+}, e de fosfatases envolvidas na regulação da sinalização celular. Além disso, a translocação da PKA para o núcleo permite a modulação da atividade de fatores de transcrição, como a proteína de ligação do elemento responsivo ao cAMP cíclico (CREB) ou as famílias de fatores de ativação de transcrição (AFT), levando à indução ou à repressão da expressão de genes específicos (Fig. 40.4 e Cap. 34).

Fosfodiesterases

As fosfodiesterases finalizam a sinalização por cAMP

As fosfodiesterases (PDEs) terminam a sinalização do cAMP por meio da conversão de cAMP ao seu metabólito, o 5′AMP (Fig. 40.3) . Assim, elas possuem o potencial de desempenhar seus papéis cruciais na regulação de diversas respostas fisiológicas em muitas células e tecidos diferentes. De fato, foi postulado que elas regulam a ativação plaquetária, o relaxamento vascular, a contração do músculo cardíaco e a inflamação, tornando-as alvos atrativos para o desenvolvimento de inibidores seletivos para atuarem como potenciais agentes terapêuticos. Por exemplo, um grupo de compostos, as metilxantinas – que incluem a teofilina e a isobutilmetilxantina – tem sido utilizado como broncodilatadores no tratamento da asma e também são capazes de exercer respostas inotrópicas positivas no coração. Mais ainda, os fármacos seletivos para a classe de enzimas PDE_3, como a milrinona, são cardiotônicos e aumentam a força de contração do coração, presumivelmente pelo aumento das concentrações de cAMP e estimulando a PKA, o que leva à fosforilação dos canais de cálcio cardíacos e a um aumento subsequente da concentração intracelular de cálcio.

Íon cálcio

O íon cálcio (Ca^{2+}) é um mensageiro onipresente e tem importante função na transdução de sinais, levando a respostas celulares, como as alterações da motilidade celular, à fertilização de ovos, à neurotransmissão e à secreção de proteína, assim como à fusão, diferenciação e proliferação celular.

As células gastam uma considerável quantidade de energia para manter um gradiente de concentração constante de Ca^{2+} extracelular/intracelular. Por exemplo, no estado de repouso, a concentração de Ca^{2+} intracelular em células não estimuladas é da ordem de 10^{-7} mol/L (100 nM), enquanto a concentração de Ca^{2+} extracelular é tipicamente 10^{-3} mol/L (1 mM). Esse gradiente permite alterações rápidas, abruptas e transitórias nas concentrações de Ca^{2+}: a ligação de uma ampla variedade de receptores hormonais, por exemplo, leva a um aumento rápido e transitório (em segundos) da concentração de Ca^{2+} intracelular para a faixa micromolar (compare com Figura 8.4). O rápido aumento e diminuição das concentrações de Ca^{2+} é rigidamente regulado e utiliza uma variedade de mecanismos que envolvem a compartimentalização das células. Por exemplo, as concentrações de Ca^{2+} intracelulares podem ser reduzidas pelo sequestro de Ca^{2+} para o interior do retículo endoplasmático pelas Ca^{2+}-ATPases ou para as mitocôndrias utilizando o gradiente eletroquímico dependente de energia. Alternativamente, o Ca^{2+} livre pode ser quelado por proteínas ligantes de Ca^{2+}, como a calsequestrina.

Diversos eventos de sinalização mediados pelo Ca^{2+} são modulados pela proteína de ligação e sensora de Ca^{2+}, a calmodulina

A calmodulina é uma proteína de 17 kDa encontrada em todas as células de animais e de plantas (consiste em até 1% da proteína celular). Ela pertence a uma família de proteínas caracterizadas por uma ou mais cópias de uma porção estrutural ligante do Ca^{2+}, chamada de porção EF (Fig. 40.6). A calmodulina é composta de dois domínios globulares similares ligados por uma α-hélice longa (6,5 nm; 65 Å), sendo que cada lobo globular contém duas porções EF/sítios ligantes de Ca^{2+}, separados por 1,1 nm (11 Å). A ligação de três ou quatro íons de cálcio (que ocorre quando a concentração intracelular de cálcio está aumentada em aproximadamente 500 nmol/L) induz uma importante alteração conformacional que permite que a calmodulina se ligue e modifique proteínas, como a PDE dependente de cAMP. A ligação de diversos íons de cálcio permite a cooperação na ativação da calmodulina, de tal forma que pequenas alterações na concentração de Ca^{2+} causam grandes alterações na concentração do complexo ativo Ca^{2+}-calmodulina (Ca^{2+}/CAM), amplificando o sinal original do hormônio.

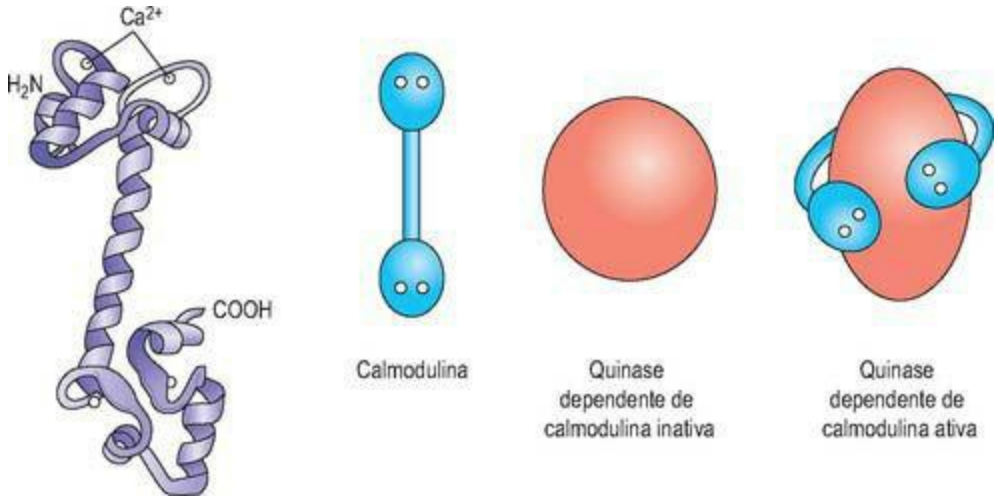


Fig. 40.6 Estrutura e função da calmodulina. A ligação de cálcio induz uma alteração conformacional, permitindo que a calmodulina se ligue e modifique a atividade de enzimas-alvo de sinalização.

A calmodulina tem grande quantidade de alvos efetores, inclusive as proteínas quinases dependentes de Ca^{2+}/CAM, que fosforilam resíduos de serina-treonina em proteínas que regulam uma variedade de processos. Por exemplo, a quinase de ampla especificidade, a Ca^{2+}/CAM-quinase II, está envolvida na regulação do metabolismo energético, na permeabilidade iônica, na biologia de neurotransmissores e na atividade da quinase da cadeia leve de miosina e da fosforilase quinase. Interessantemente, a calmodulina funciona como uma subunidade regulatória permanente da fosforilase quinase e pode também regular efetores não quinase, como determinadas isoformas da adenilato ciclase e também de PDEs dependente de cAMP, indicando "*cross-talk*" entre as vias de sinalização dependentes de cAMP e de Ca^{2+}. Mais ainda, camundongos deficientes em adenilato ciclase dependente de calmodulina são deficientes em memória espacial, mostrando que esse sistema de transdução de sinal é importante para o aprendizado e a memória dos vertebrados.

INSUFICIÊNCIA CARDÍACA – SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR β-ADRENÉRGICO (βAR) COMO ALVO POTENCIAL DE TERAPIA GÊNICA?

A doença cardíaca é a principal causa de morte em países desenvolvidos e, apesar dos recentes avanços das terapias, como os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACE) (Cap. 23), o prognóstico dos pacientes com insuficiência cardíaca ainda é relativamente ruim: a sobrevivência de longo prazo (mais de 5 anos) é de 50%. Normalmente, a ligação de catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) aos βAR ativa a proteína Gαs ao estimular a adenilato ciclase a formar cAMP, resultando na ativação da PKA e, finalmente, ao acoplamento excitação-contração mediado por meio do cálcio, regulação da frequência cardíaca (cronotropia), contratilidade (inotropia) e relaxamento (lusitropia). Em contraste, na insuficiência cardíaca, os miócitos exibem alterações características na sinalização do βAR e consequente mobilização de cálcio, resultando na redução da função cardíaca. Especificamente, a expressão de βAR apresenta-se reduzida e os receptores remanescentes parecem estar dessensibilizados devido ao aumento dos níveis da regulação negativa da sinalização do βAR, realizado pela βAR quinase (βARK). Além disso, foram identificados polimorfismos específicos (mutações) nos βARs em humanos que estão associados a mau prognóstico após a insuficiência cardíaca. Após o uso de fármacos que têm como alvo a função do βAR, como o clembuterol, um agonista específico do β_2AR, houve muito interesse no potencial terapêutico da modulação da sinalização dessa via pela terapia gênica cardíaca utilizando vetores virais. Por exemplo, os estudos em modelos animais sugerem que existe um potencial valor terapêutico no aumento da expressão do β_2AR, mas não do β_1AR, em termos de contratilidade e de sobrevivência dos miócitos. Mais ainda, foi demonstrado que a expressão da sequência carboxiterminal da βARK (βARKct), a qual inibe a dessensibilização dos βARs mediados pela βARK, previne a insuficiência cardíaca. Da mesma forma, a superexpressão dos efetores *downstream* da cascata do βAR, como da AC_{VI}, a principal isoforma da adenilato ciclase no miocárdio, produziu efeitos terapêuticos e, de fato, ensaios clínicos de terapia gênica humana usando transferência de adenovírus da AC_{VI} estão atualmente progredindo em estudos pré-clínicos. Finalmente, como o acoplamento do βAR à sinalização da PKA regula os receptores e os canais iônicos responsáveis pela sinalização de cálcio necessária para o acoplamento excitação-contração, reguladores da cascata inotrópica da função contrátil, como a proteína S100A1 sensora das porções EF de cálcio, que estão reguladas negativamente na insuficiência cardíaca, também são estudadas como potenciais alvos terapêuticos.

Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2)

A hidrólise do fosfolipídio de membrana, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, forma dois segundos mensageiros

A principal descoberta na pesquisa dos segundos mensageiros responsáveis pela mobilização do cálcio ocorreu no início dos anos 1980, quando foi descoberto que a estimulação de receptores, que sabidamente aumentavam a concentração intracelular de Ca^{2+} livre poderia ativar a hidrólise prévia mediada pela fosfolipase C (PLC) de um tipo menor de fosfolipídio, o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2). O PIP_2, que representa 0,4% dos fosfolípidios totais nas membranas, é gerado a partir do fosfatidilinositol por duas quinases, a fosfatidilinositol-4-quinase (PI-4-K ou PI quinase) e a fosfatidilinositol-5-quinase (PI-5-K ou PIP quinase), sendo ambas encontradas na membrana plasmática (Fig. 40.7). O PIP_2 é hidrolisado por uma PLC específica para PIP_2, gerando dois segundos mensageiros: o trifosfato de inositol (I-1,4,5-P_3 ou IP_3) e o diacilglicerol (DAG). O IP_3 é um produto hidrossolúvel liberado no citosol, e foi demonstrada sua capacidade em mobilizar os estoques intracelulares de cálcio. O DAG é um segundo mensageiro lipídico, que permanece ancorado à membrana plasmática em virtude de suas cadeias laterais compostas de ácidos graxos hidrofóbicos, e ativa uma família de enzimas-chave de sinalização, como a proteína quinase C (PKC).

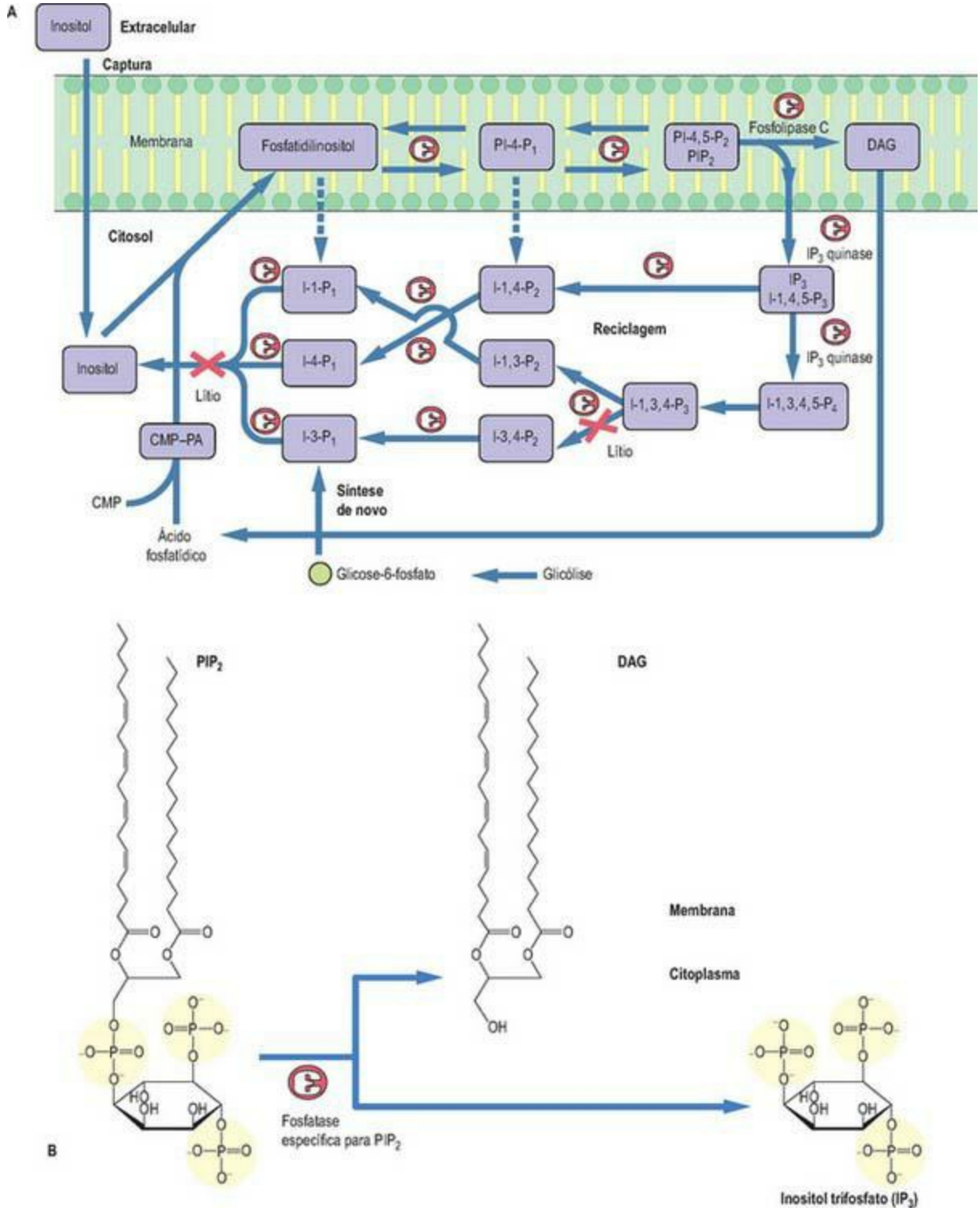


Fig. 40.7 O ciclo de sinalização do fosfatidilinositol. O fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) é formado a partir do fosfatidilinositol pela PI-4-quinase e PI-5-quinase (A). O PIP_2 é hidrolisado por uma PLC específica para PIP_2, gerando dois segundos mensageiros: I-1,4,5-P_3 (IP_3) e DAG (B). O IP_3 é liberado no citosol, e foi demonstrada sua capacidade em mobilizar os estoques intracelulares de cálcio. O DAG é um segundo mensageiro lipídico, que é ancorado na membrana plasmática, e ativa a PKC. O IP_3 é degradado pela (i) ação sequencial de fosfatases convertendo o I-1,4,5-P_3 a inositol e (ii) uma IP_3 quinase, que forma I-1,3,4,5-P_4, que é a seguir degradada a inositol pela fosfatase específica, inositol fosfatase, sendo que algumas podem ser inibidas pelo LiCl. DAG, diacilglicerol; PA, ácido fosfatídico; CMP-PA, monofosfato de citidina-ácido fosfatídico (painel A).

Trifosfato-1,4,5 de inositol (IP_3)

O IP_3 é importante na mobilização intracelular

A rápida produção (<1 segundo) e remoção ($t_{½}$ = 4 segundos no fígado) do IP_3 que antecede um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular sugeriu que ele poderia ser um segundo mensageiro de sinalização da mobilização de cálcio. Dois tipos de experimentos confirmaram que o IP_3 é realmente um segundo mensageiro:

- **a microinjeção de IP_3 nas células** ou simplesmente a inclusão de IP_3 em incubações de células nas quais o tratamento com detergente induziu a formação de orifícios ou poros na membrana plasmática (células permeabilizadas), mobilizou o cálcio na ausência da estimulação por hormônios.

- **a análise da estrutura-função** de uma variedade de moléculas de fosfato de inositol sugeriu que a mobilização de cálcio era dependente de receptores específicos de IP_3.

Foram clonados receptores de IP_3 que exibem a propriedade de ligar o IP_3 e de liberar cálcio. Esses receptores são expressos no retículo endoplasmático de todas as células, como uma família de glicoproteínas relacionadas (massa molecular 250 kDa), que compreende seis domínios transmembrana. O receptor ativo é expresso como um multímero de quatro moléculas receptoras de IP_3, sendo que essa estrutura tetramérica ocasiona a cooperação na atividade dos canais de Ca^{2+}. Foi estimado que o IP_3 estimulado (normalmente 2-3 mmol/L) libera 20-30 íons cálcio. Esse cálculo revela a amplificação inerente a essa cascata de sinalização, uma vez que, normalmente, somente concentrações nanomolares de fator de crescimento são necessárias para induzir concentrações milimolares desse segundo mensageiro. Consistente com a natureza transitória da liberação de cálcio intracelular que é observada após a interação entre o hormônio e o receptor, as concentrações celulares de IP_3 rapidamente voltam aos valores de repouso (0,1 mmol/L) por mais de uma via de degradação (Fig. 40.7).

Diacilglicerol (DAG)

O DAG ativa a proteína quinase C

O DAG exerce seu papel de segundo mensageiro pela ativação da enzima-chave de sinalização, a proteína quinase C (PKC), que fosforila serina e treonina de uma grande variedade de proteínas-alvo da transdução de sinal. A PKC foi originalmente identificada como uma quinase dependente de cálcio e lipídio (fosfatidilserina) importante na regulação da proliferação celular. Entretanto, nos últimos anos, tornou-se claro que a PKC é, na realidade, um nome genérico para a superfamília de quinases relacionadas que têm diferentes distribuições teciduais e exigências de ativação (Tabela 40.3). Contudo, todas essas enzimas compartilham algumas características comuns; particulamente, elas possuem dois domínios principais: um domínio regulatório *N*-terminal e um domínio catalítico quinase *C*-terminal. O domínio regulatório contém uma sequência do pseudossubstrato que se assemelha ao sítio de fosforilação nos substratos da PKC. Na ausência da ativação dos cofatores (Ca^{2+}, fosfolipídio, DAG), essa sequência de pseudossubstrato interage com a fenda de ligação do substrato no domínio catalítico e reprime a atividade da PKC, sendo que a ligação de cofatores reduz a afinidade dessa interação, induz uma alteração conformacional na PKC e permite a estimulação da atividade da PKC. Consistente com o fato de que o ativador/cofator, DAG, está ancorado na membrana, a ativação da PKC está geralmente associada à translocação do citosol para o plasma ou para as membranas nucleares. Apesar de geralmente se considerar a PKC uma serina quinase, ela pode fosforilar resíduos de treonina, mas nunca de tirosina. De forma interessante, a PKC pode fosforilar os mesmos alvos de proteínas como a PKA; porém, enquanto a PKC normalmente fosforila a proteína nos resíduos de serina, a PKA normalmente fosforila resíduos de treonina.

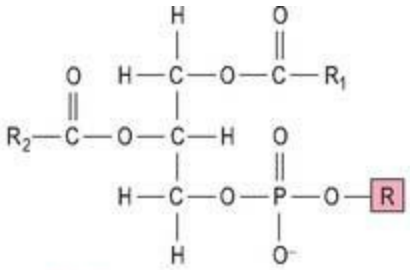
Tabela 40.3 A superfamília da proteína quinase C (PKC). Essa é um família multigênica, exceto para β1, β2 e ε/ε', que são formas de *splicing* alternativas de β e ε.

	PKCs clássicas				PKCs novas				PKCs atípicas		
Designação PKC	α	β1	β2	γ	δ	ε/ε'	η	θ	μ	ι/λ	ζ
Massa molecular (kDa)	82	80	80	80	78	90	80	79	115	74	72
Ativadores											
[Ca^{2+}]	sim	sim	sim	sim	não	não	não	não		não	não
DAG	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim		não	não
Distribuição tecidual	todos	alguns	muitos	neural	todos	neural	muitos	músculo, pele		ovário, testículos	todos

DAG, diacilglicerol

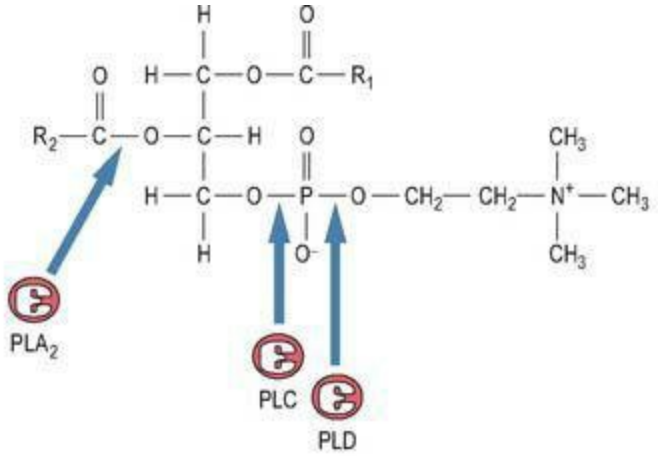
As fofolipases hidrolisam a fosfatidilcolina ou fosfatidiletanolamina formando segundos mensageiros lipídicos

Em diversos sistemas hormonais, apesar de a hidrólise do PIP_2 estimulada pelo receptor ser transitória e rapidamente inativada (dessensibilizada), a geração de DAG é mantida. Junto com as recentes descrições de múltiplas isoformas de PKC, algumas das quais não necessitam de Ca^{2+} ou de DAG para sua ativação (Tabela 40.3), esses achados levaram à descoberta de vias de sinalização lipídica adicionais acopladas ao receptor, envolvendo hidrólise de fosfatidilcolina ou de fosfatidiletanolamina (Fig. 40.8), que pode levar à formação de DAG e de outros lipídios biologicamente ativos (Fig. 40.9) em resposta a uma grande variedade de fatores de crescimento e de mitógenos. A fosfatidilcolina corresponde a aproximadamente 40% dos fosfolipídios celulares totais. Ela pode ser hidrolisada por fosfolipases distintas, formando uma diversidade de segundos mensageiros lipídicos, incluindo o ácido araquidônico (formado pela PLA_2), assim como diferentes espécies de DAG (formado pela PLC) e ácido fosfatídico (formado pela PLD). Também foram descritas atividades da fosfatidiletanolamina-PLD estimuladas por hormônios.



Fosfolipídio	R -Resíduo
Ácido fosfatídico	Hidrogênio
Fosfatidilcolina	Colina
Fosfatidiletanolamina	Etanolamina
Fosfatidilserina	Serina
Fosfatidilinositol	Mioinositol

Fig. 40.8 Potenciais segundos mensageiros lipídicos: fosfoglicerídeos. R_1/R_2, cadeias laterais de ácidos graxos.



Enzima	Produtos
Fosfolipase A_2 (PLA_2)	Lisofosfatidilcolina PC (1-acil) + ácido graxo
Fosfolipase C (PLC)	DAG + fosfato de colina
Fosolipase D (PLD)	Ácido fosfatídico + colina

Fig. 40.9 Produtos da degradação da fosfatidilcolina.

Alguns hormônios ou fatores do crescimento podem estimular somente uma ou outra dessas fosfolipases, porém outros ligantes podem estimular todas essas vias após a ligação aos seus receptores específicos. Existe, portanto, o potencial de formar múltiplas espécies distintas de DAG e de ácido fosfatídico, que refletem diferentes cadeias laterais de ácidos graxos (Fig. 40.10) da PIP_2 (predominantemente estearato/araquidonato) e substratos fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. Mais ainda, as espécies de DAG podem ser metabolizadas produzindo ácido araquidônico por meio da DAG lipase ou, alternativamente, a DAG pode ser convertida a ácido fosfatídico por meio da DAG quinase. Da mesma forma, o ácido fosfatídico pode ser interconvertido em DAG pela ação da ácido fosfatídico fosfo-hidrolase.

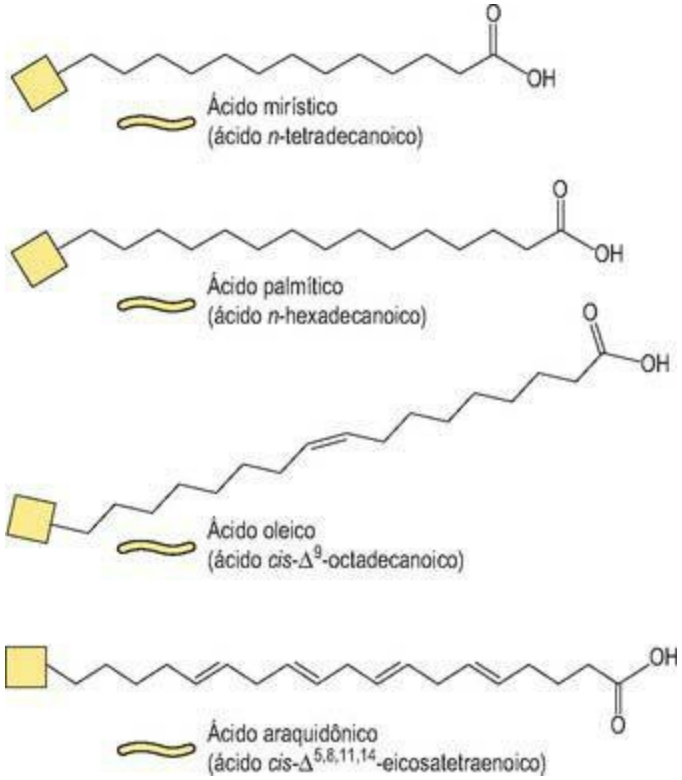


Fig. 40.10 Cadeias laterais de ácido graxo em fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina.

Existem fortes evidências de que todos esses segundos mensageiros lipídicos distintos possuem diferentes alvos. Por exemplo, foi sugerido recentemente que DAGs contendo ácidos graxos saturados/monoinsaturados derivados da ativação da fosfolipase D específica de fosfatidilcolina (PLD) são incapazes de ativar isoformas de PKC e que somente as espécies de ácido estearoil-araquidonil-fosfatídico podem modular a atividade da GTPase da *Ras* (Cap. 43). Portanto, a formação desses segundos mensageiros lipídicos diversos, porém relacionados, fornece um mecanismo para a iniciação ou o término das respostas específicas aos hormônios, por meio de cascatas de transdução de sinal particulares, que inclui a ativação diferencial das isoformas da PKC.

O ácido araquidônico é um segundo mensageiro que regula fosfolipases e proteínas quinases

O ácido araquidônico é um ácido graxo poli-insaturado C20 que contém quatro duplas ligações (Fig. 40.10). Além de estar envolvido como um segundo mensageiro lipídico na regulação de enzimas de sinalização, como a PLC-γ, a PLC-δ e as isoformas PKC-α, β e γ, o ácido araquidônico é um intermediário inflamatório-chave. Entretanto, o ácido araquidônico envolvido nessas diversas funções parece ser gerado por duas vias distintas de PLA_2. O ácido araquidônico formado para função de sinalização aparentemente é derivado da ação de uma fosfolipase A_2 citosólica fosfatidilcolinaespecífica ($cPLA_2$), que possui massa molecular de 85 kDa e é regulada pela fosforilação de resíduos-chave de serina. Em contraste, o ácido araquidônico inflamatório é gerado pela ação de uma família de proteínas secretoras de PLA_2 ($sPLA_2$) de baixo peso molecular (14-18 kDa), que parecem ser onipresentes e são encontradas em altas concentrações no veneno de cobra e no suco pancreático. Mais ainda, o ácido araquidônico pode ser gerado pela DAG lipase.

PROTEÍNA QUINASE C E CÂNCER

A proteína quinase C (PKC) foi primeiro identificada como o receptor intracelular para ésteres de forbol, que são agentes químicos promotores de tumores utilizados em modelos experimentais, para induzir câncer de pele. Desde então, tornou-se claro que a PKC é um nome genérico para uma família de quinases direcionadas para serina/treonina, envolvidas na regulação da proliferação celular normal que, quando desregulada, tem sido relacionada na promoção de uma variedade de condições patológicas, incluindo o câncer, a doença cardiovascular e a inflamação. O advento dos modelos de camundongos transgênicos e *knockout* já identificou funções distintas das isoformas individuais de PKC em todos os aspectos (hiperproliferação, metástase e angiogênese) da tumorigênese. Por exemplo, a superexpressão da PKCβII leva à hiperproliferação do epitélio do cólon e ao aumento da suscetibilidade ao câncer de cólon induzido por carcinógenos em camundongos. Consistente com isso, o inibidor seletivo de PKCβ, a enzastaurina, bloqueia a proliferação das células do câncer de cólon. De forma interessante, essa inibição pode ter potencial terapêutico em uma variedade de outros cânceres, uma vez que também pode inibir a proliferação de câncer de mama, do glioma e de linfoma de células T e, de fato, atualmente está sendo submetido a ensaio clínico em pacientes com câncer avançado. De forma semelhante, a superexpressão da PKCα leva a hiperfosforilação, formação de tumor e metástase de células de câncer de mama, enquanto a superexpressão de PKCε promove o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas matastático. Em contraste, a PKCδ normalmente parece antagonizar a formação do tumor, uma vez que pode suprimir a proliferação e a indução de apoptose e, de acordo com isso, a superexpressão da PKCδ promove resistência aos camundongos na formação de tumores induzidos por ésteres de forbol. Em geral, acredita-se que a sinalização de várias isoformas de PKC promova metástases pela modulação tanto da adesão regulada por integrina quanto da migração e também da secreção de metaloproteinases da matriz necessárias para o remodelamento da base da membrana. Mais ainda, acredita-se que as PKCs, tal como a PKCβ, promovem a transdução de VEGF e neovascularização produzida pela hipóxia e angiogênese necessária para o crescimento do tumor e, consistente com

isso, também foi demonstrado que a enzastaurina possui atividade antiangiogênica em vários cânceres. Felizmente, as mutações nas isoformas de PKC que levam aos cânceres humanos são raros, apesar de ter sido encontrada uma única mutação de ponto na PKCα (D294G) em tumores pituitários metastáticos e em adenomas foliculares de tireoide e em carcinomas. Da mesma forma, raramente ocorrem rearranjos cromossômicos oncogênicos envolvendo as isoformas da PKC, porém já foram relatados, por exemplo em relação à PKCε, no câncer de tireoide. Por outro lado, níveis de expressão estão alterados em muitos cânceres e, frequentemente, tais alterações efetivas na expressão se correlacionam com o progresso da doença, sugerindo que possam ser biomarcadores úteis da doença. O desafio agora é o desenvolvimento de agonistas e de antagonistas específicos para as isoformas, diversos dos quais já estão sob ensaio clínico, como terapias tendo como alvo efetivo tumores e outras condições patológicas, sem o desequilíbrio da função celular saudável.

Eicosanoides

O ácido araquidônico é o precursor dos eicosanoides, que compreendem as prostaglandinas, as prostaciclinas, os tromboxanos e os leucotrienos

Como um mediador inflamatório-chave, o ácido araquidônico é o principal precursor de um grupo de moléculas chamadas de eicosanoides, que compreendem as prostaglandinas, as prostaciclinas, os tromboxanos e os leucotrienos. Os eicosanoides (Fig. 40.11) atuam como hormônios e sinalizam por meio de receptores acoplados à proteína G. Eles possuem uma grande variedade de atividades biológicas, incluindo a modulação da contração do músculo liso (tônus vascular), da agregação plaquetária, da secreção de ácido gástrico e do equilíbrio hidroeletrolítico, assim como a mediação da dor e as respostas inflamatórias. Mais ainda, camundongos *knockout* deficientes para a produção de prostaglandina mostraram que as prostaglandinas possuem mais funções do que previamente se acreditava, estando envolvidas no controle de processos complexos como a gravidez e a disseminação de tumor e metástase no câncer de cólon (Cap. 43).

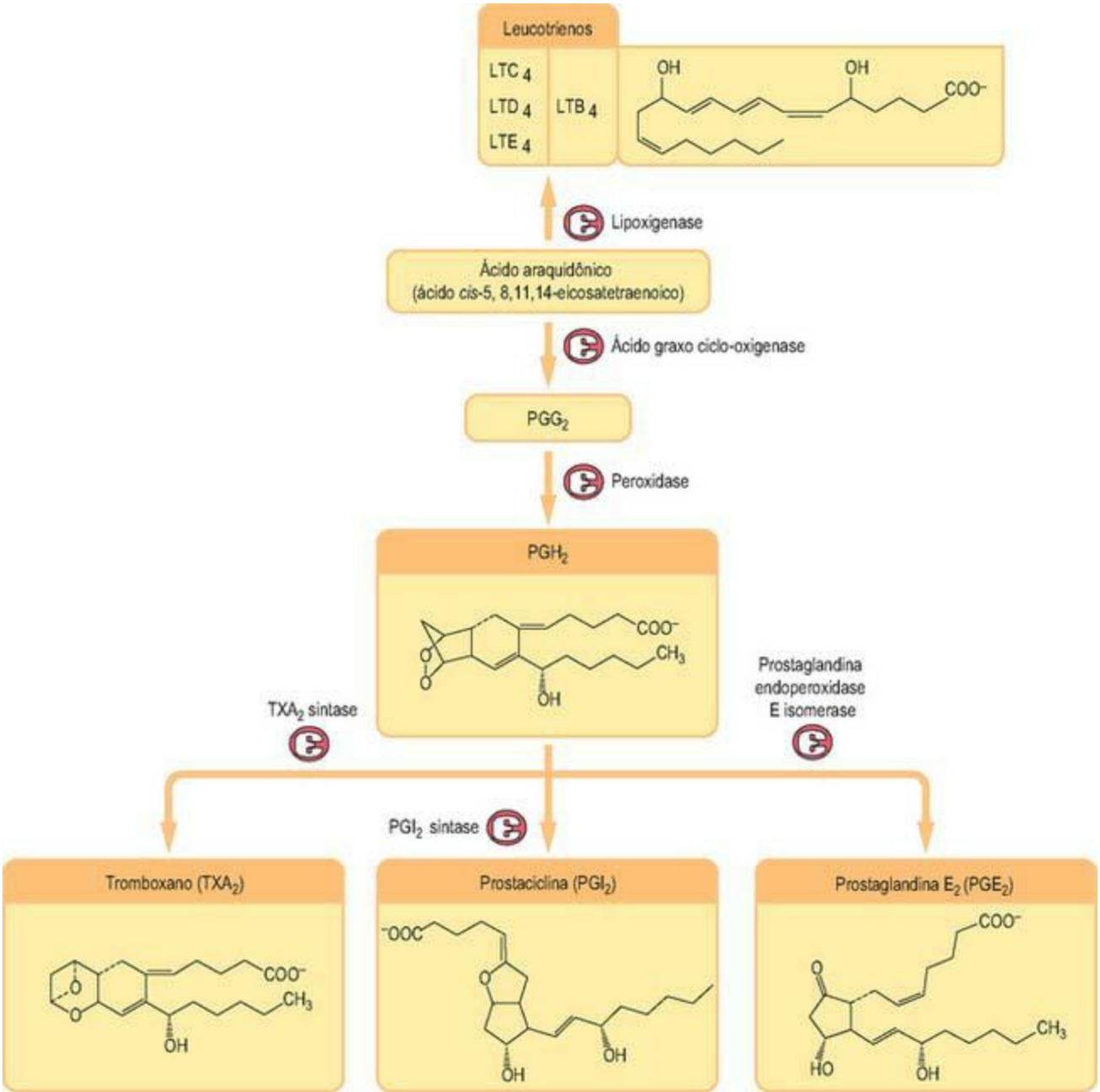


Fig. 40.11 Síntese dos eicosanoides. Os eicosanoides são primariamente derivados do ácido araquidônico. Os leucotrienos (LT) são sintetizados por meio da via dependente de lipoxigenase, enquanto prostaglandinas (PG), prostaciclinas e tromboxanos (TX) são produzidos pelas vias dependentes da ciclo-oxigenase.

OS FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS TÊM COMO ALVO A SÍNTESE DE PROSTAGLANDINA

As prostaglandinas orquestram incontáveis respostas fisiológicas: elas estimulam a inflamação, regulam o fluxo sanguíneo para órgãos como o rim, controlam o transporte iônico através das membranas, modulam a transmissão sináptica e induzem o sono. As prostaglandinas são geralmente derivadas do transmissor inflamatório chave, o ácido araquidônico, que por sua vez pode ser produzido pela hidrólise mediada pela PLA_2 de vários fosfolipídios, tal como a fosfatidilcolina.

Os fármacos anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs), como a aspirina e o ibuprofeno, reduzem a inflamação, a dor e a febre por meio da inibição da síntese das prostaglandinas, bloqueando a primeira etapa de conversão do ácido araquidônico no precursor comum das prostaglandinas, o PGG_2, pela enzima ciclo-oxigenase. Existem duas formas de enzima. A ciclo-oxigenase 1 (COX-1) é principalmente constitutiva e encontrada em plaquetas, no estômago e no rim. A ciclo-oxigenase 2 (COX-2) é principalmente induzível e responsável pela síntese das prostaglandinas inflamatórias. A aspirina (acetilsalicilato) modifica covalentemente e inativa irreversivelmente ambas as formas da enzima por acetilação. Como a inibição da atividade da ciclo-oxigenase também irá bloquear a produção do potente vasoconstritor e agregador plaquetário, o tromboxano A_2 (TXA_2, também derivado do precursor comum, a PGG_2), a aspirina também pode ser utilizada como um agente profilático, na prevenção da coagulação sanguínea excessiva que pode levar a ataques cardíacos e a acidente vascular. Estudo de metanálise realizado pelo Antiplatelet Trialists Collaboration a respeito da aspirina na prevenção secundária mostrou que a redução no risco de acidente vascular recorrente foi de aproximadamente 15%. O uso combinado da aspirina com o dipiridamol, que reduz a agregação plaquetária pelo aumento da concentração de cAMP, pode reduzir ainda mais o risco. Outras drogas antiplaquetárias efetivas são as tienopiridinas, a ticlopidina e o clopidogrel, que bloqueiam a agregação plaquetária induzida por ADP. Os inibidores seletivos da COX, como o celecoxib, são também eficazes nos tratamentos de condições inflamatórias, como a artrite reumatoide, e sua eficiência e tolerabilidade estão sendo comparadas aos NSAIDs convencionais. Mais ainda, as crescentes evidências de que os mediadores inflamatórios derivados da COX-2 como as PGE_2 promovem crescimento tumoral e metástase despertaram o interesse no uso de NSAIDs na terapêutica do câncer. De fato, foi demonstrado que a expressão da COX-2 está elevada no câncer colorretal e na maioria dos adenomas e adenocarcinomas, e, corroborando esses fatos, estudos populacionais demonstraram que o uso de NSAID está associado à redução do risco de desenvolvimento de câncer colorretal e de polipose adenomatosa familiar. Isso levou ao desenvolvimento de ensaios clínicos com o objetivo de avaliar o potencial dos inibidores da COX-2, como o celecoxib, na prevenção do câncer colorretal, tanto como fármaco único quanto como um componente de terapia combinada. Os hormônios corticosteroides, como a cortisona, também são fármacos anti-inflamatórios que têm como alvo a síntese das prostaglandinas. Nesse caso, entretanto,

esses agentes não afetam a ciclo-oxigenase, mas parecem inibir a atividade da PLA_2 que gera o intermediário-chave, o ácido araquidônico. Esses fármacos, portanto, são úteis no tratamento das respostas inflamatórias que envolvem o recrutamento de leucócitos ou a asma, uma vez que a produção de ácido araquidônico como alvo, aliada ao bloqueio da síntese de prostaglandina, também inibe a produção de leucotrienos.

As prostaglandinas são sintetizadas nas membranas a partir do ácido araquidônico

O primeiro estágio da conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas envolve o componente ciclo-oxigenase da prostaglandina sintase, que induz a formação de um anel ciclopentano e a introdução de quatro átomos de oxigênio para formar o intermediário, a prostaglandina G_2 (PGG_2). A PGG_2 sofre então uma reação de hidroperoxidase que catalisa a redução de dois elétrons do grupo 15-hidroperoxi para um grupo 15-hidroxil, formando o intermediário altamente instável, o PGH_2, que pode ser então convertido em outras prostaglandinas, prostaciclinas e tromboxano.

Foram identificadas duas isoformas distintas de ciclo-oxigenase, chamadas de COX-1 e COX-2. Enquanto a COX-1 é constitutivamente expressa, a COX-2 é produzida somente em resposta aos mediadores inflamatórios, como as citocinas. Os inibidores da ciclo-oxigenase, os fármacos anti-inflamatórios não esteroides, como a aspirina e o ibuprofeno, atuam na redução da inflamação e aliviam a dor por meio do bloqueio dessa primeira etapa da produção das prostaglandinas. Apesar de os fármacos atualmente no mercado bloquearem preferencialmente a COX-1, diversos fármacos seletivos de COX-2 estão em desenvolvimento, já que se acredita que a COX-2, sendo induzida sob condições de inflamação, deve ter função mais importante do que a COX-1 na mediação da resposta inflamatória. Além disso, os principais efeitos adversos do bloqueio da COX-1 são o sangramento e a inflamação da mucosa gástrica, e o emprego de inibidores seletivos da COX-2 permite ter como alvo a atividade inflamatória e, assim, evitar as principais sequelas associadas ao uso dos inibidores da COX-1 (quadro da pág. 566).

Leucotrienos

O ácido araquidônico também é convertido em outros mediadores inflamatórios e vasoativos, chamados de leucotrienos, pela ação de uma variedade de lipoxigenases estruturalmente relacionadas (Fig. 40.11). Por exemplo, a 5-lipoxigenase é formada tanto por uma atividade dioxigenase que converte o araquidonato em ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE) e uma atividade desidratase que transforma o 5-HPETE em leucotrieno A_4 (LTA_4). As deficiências naturais nas lipoxigenases foram associadas a doenças humanas: por exemplo, em um estudo foi descrito que 40% dos pacientes com distúrbios mieloproliferativos apresentavam redução da atividade da lipoxigenase plaquetária e aumento da síntese de tromboxano. Além disso, camundongos deficientes de 5-lipoxigenase exibem defeitos nas respostas neutrofílicas a imunocomplexos e ao fator ativador de plaquetas, sustentando a ideia de que os leucotrienos têm funções importantes nas respostas inflamatórias.

SÍNDROME DE McCUNE-ALBRIGHT (INCIDÊNCIA DE 1 EM 25.000)

Uma menina de 3 anos de idade foi levada ao hospital devido à preocupação de sua mãe em relação ao desenvolvimento aparente de mama, nos últimos seis meses, e de uma mancha de sangue em suas calças na semana anterior. No exame, ela apresentava estágio 3 de Tanner de desenvolvimento de mama. Em seu tronco, apresentava três áreas de pigmentação "café com leite" na pele, com bordas ásperas.

Comentário. Essa criança está sofrendo da síndrome de McCune-Albright. Ela está prestes a desenvolver displasia fibrosa poliostótica com áreas de afinamento e esclerose nos ossos longos, que podem sofrer fraturas. Outras endocrinopatias incluem tirotoxicose, hipersecreção de GH, síndrome de Cushing (excesso de cortisol) e hiperparatireoidismo. A causa é uma mutação de ganho de função do gene que codifica a subunidade $G_s\alpha$ da proteína G que estimula a formação de AMP cíclico. O problema se apresenta em seguimento a uma mutação celular somática com características clínicas dependentes de uma distribuição do tipo mosaico de células anômalas.

RADIOIMUNOENSAIO (RIA) PARA cAMP

A ação do paratormônio (PTH) no túbulo renal leva à liberação de cAMP na urina (Cap. 25). A determinação clínica dos níveis de cAMP é um indicador útil da função da paratireoide. Cerca de 90% dos pacientes com hiperparatireoidismo possuem níveis de cAMP nefrogênico aumentado (cAMP urinário menos cAMP plasmático filtrado, mas não reabsorvido no rim). Além disso, a infusão de PTH causa um drástico aumento nas concentrações urinárias de cAMP em pacientes com hipoparatireoidismo idiopático, mas não em pacientes com pseudo-hipoparatireoidismo tipo I, que têm uma mutação na $G_{s\alpha}$ e, portanto, exibem uma resposta tubular renal deficiente ao PTH, levando à redução da secreção de cAMP.

Os níveis de cAMP podem ser analisados por radioimunoensaio (RIA), que mede a competição da ligação a um anticorpo específico para cAMP imobilizado entre um reagente de ensaio com cAMP

marcado com ^{125}I e cAMP não marcado em uma amostra de paciente (Fig. 40.12). A dosagem quantitativa dos níveis de cAMP pode ser realizada utilizando-se concentrações conhecidas de reagente de ensaio de cAMP não marcado para construir uma curva padrão (Cap. 39; compare com o quadro da pág. 532).

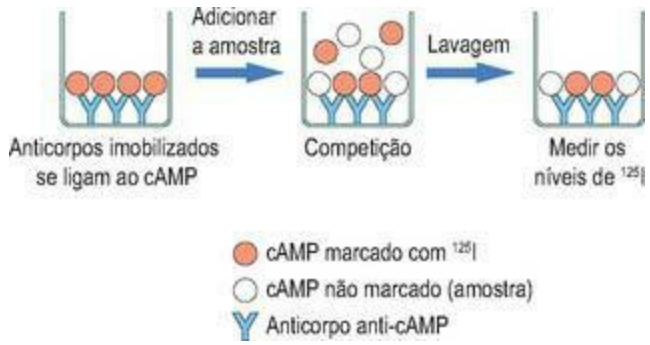


Fig. 40.12 Dosagem de cAMP por radioimunoensaio (RIA). O cAMP não presente na amostra do paciente compete com o cAMP marcado com ^{125}I, presente no reagente do ensaio, pela ligação ao anticorpo anti-cAMP pré-imobilizado. Após a lavagem, os níveis de ^{125}I são inversamente proporcionais aos níveis de cAMP na amostra do paciente. A análise quantitativa pode ser realizada pela construção de uma curva padrão. Compare com o ensaio sanduíche por imunorradiometria para hormônios (Fig. 39.2).

Resumo

- As células respondem especificamente a uma multiplicidade de sinais de seu ambiente por meio de elementos de transdução de sinal, que são formados por receptores específicos na superfície da membrana celular, sistemas efetores de sinalização (p. ex., adenilato ciclase, fosfolipases ou canais iônicos) e proteínas regulatórias (p. ex., proteínas G ou tirosina quinases).

- Esses elementos de transdução de sinal servem para detectar, amplificar e integrar diversos sinais externos para gerar as respostas celulares apropriadas.

- A variedade de famílias de receptores de superfície celular percebe e transduz seus sinais hormonais específicos pelo acoplamento transmembrana a diferentes sistemas efetores para gerar moléculas de baixo peso molecular, chamadas de segundos mensageiros, como cAMP, IP_3, DAG e Ca^{2+}, que modulam suas funções de sinalização pela ativação de proteínas quinases-chaves.

- A especificidade de uma resposta a um hormônio em particular pode ser intensificada por uma variedade de atividades de sinalização das fosfolipases (PLC, PLD e PLA_2). Levando-se em conta a variedade de potenciais substratos lipídicos (p. ex., PIP_2, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) e produtos (p. ex., DAG, ácido fosfatídico e ácido araquinoico), as fosfolipases podem gerar uma grande variedade de segundos mensageiros lipídicos que influenciam de forma diferente a atividade de proteínas quinases-chaves. Como, por exemplo, muitos dos membros da família da PKC parecem ter repertórios distintos de substratos que fazem a transdução de sinal, a ativação diferenciada de determinadas isoformas de PKC pode, em última instância, determinar o tipo específico de resposta biológica obtida.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Como são as respostas celulares apropriadas desencadeadas por hormônios específicos?

2. Como os segundos mensageiros propagam os sinais intracelulares?

3. Como os NSAIDs, como a aspirina e o ibuprofeno, atuam?

Leituras sugeridas

DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Beta-arrestins and cell signalling. *Ann Rev Physiol*. 2007;69:483-510.

Lefkowitz RJ. Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007;190:9-19.

Putney JW. Recent breakthroughs in the molecular mechanism of capacitative calcium entry (with thoughts on how we got here). *Cell Calcium*. 2007;42:103-110.

Rozengurt E. Mitogenic signalling pathways induced by G-protein coupled receptors. *J Cell Physiol*. 2007;213:589-602.

Scott JD. Compartmentalised cAMP signalling: a personal perspective. *Biochem Soc Trans*. 2006;34:465-467.

Smith WL. Nutritionally essential fatty acids and biologically indispensable cyclooxygenases. *Trends Biochem Sci*. 2008;33:27-37.

Sites

Área de conhecimento Área de conhecimento de transdução de sinal da revista *Science*:. www.stke.org.

Página sobre biologia de Kimball. www.biology-pages.info/C/CellSignaling.

Projeto em biologia (Universidade de Arizona). www.biology.arizona.edu/cell_bio/problem_sets/signaling.

Vias de sinalização celular BioCarta. www.biocarta.com/genes/CellSignaling.asp.

Neuroquímica

E.J. Thompson

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os componentes celulares do sistema nervoso central.
- Discutir a função da barreira hematoencefálica na saúde e na doença.
- Descrever os princípios básicos da sinalização neuronal e de seus receptores.
- Descrever a transmissão adrenérgica e colinérgica.
- Descrever a função dos canais iônicos na transmissão nervosa.
- Comentar a função dos íons sódio, potássio e cálcio na transmissão nervosa.
- Discutir o processo de visão como exemplo de processo químico subjacente à função neuronal.

INTRODUÇÃO

O encéfalo é, de muitas formas, um deleite para os químicos. Isso é assim porque ele ilustra diversos princípios gerais da biologia aplicados a um tecido altamente especializado que por fim regula todos os outros tecidos do organismo. Este capítulo destaca as diferenças entre o sistema nervoso central – que é constituído pelo cérebro e pela medula espinhal – e o sistema nervoso periférico, que se encontra fora da dura-máter [a cobertura fibrosa e espessa que contém o líquido cerebroespinhal (CSF)].

O ENCÉFALO E OS NERVOS PERIFÉRICOS

A distinção entre encéfalo e nervo periférico reflete, em essência, a divisão entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP): de forma conveniente, os limites da dura-máter caracterizam a linha divisória, em cujo compartimento impermeável encontra-se o CFS, parcialmente produzido (aproximadamente um terço do volume total) por meio da ação da barreira hematoencefálica. A mielina isola os axônios dos nervos; a composição química da mielina do SNC é bem diferente da mielina do SNP, uma vez que as duas formas são produzidas por dois tipos de células diferentes: os oligodendrócitos no SNC e as células de Schwann no SNP. A distinção entre as diferentes funções do SNC e aquelas do SNP é fundamental para o diagnóstico diferencial em neurologia, e para tanto, diversos exames estão disponíveis para se fazer a diferenciação entre os dois sistemas. Um exemplo típico é a diferença entre a desmielinização que ocorre no SNC na esclerose múltipla e a desmielinização que ocorre no SNP na síndrome de Guillain-Barré.



SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ

Três semanas após uma doença diarreica aguda, um homem de 65 anos de idade apresentou fraqueza ascendente progressiva dos membros, seguida de fraqueza dos músculos respiratórios, necessitando de ventilação assistida. No exame clínico, ele se apresentava hipotônico e arreflexo, com profunda fraqueza generalizada. A focalização isoelétrica do CFS e de amostras do soro realizadas em paralelo mostrou um padrão anormal de bandas oligoclonais em ambos.

Comentário. Essa neuropatia, predominantemente motora, é a síndrome de Guillain-Barré, e o paciente desenvolve anticorpos como resultado da infecção pela bactéria. *Campylobacter jejuni*. O antígeno dessa bactéria é o açúcar gangliosídeo GM1, o qual também é encontrado nos nervos periféricos. Assim, os anticorpos se ligam aos nervos motores periféricos e causam a neuropatia. Esse é um exemplo de mimetismo molecular.

A barreira hematoencefálica

O termo "barreira" hematoencefálica é ligeiramente errôneo, uma vez que a barreira não é absoluta, mas relativa: sua permeabilidade depende do tamanho da molécula em questão

Inicialmente, os experimentos baseados no uso de um corante (azul de Evans) ligado à albumina demonstraram que, em um período de horas, todos os tecidos de um animal tornavam-se progressivamente azuis, com a notável exceção do encéfalo, que permanecia branco. Subsequentemente, tornou-se claro que uma molécula de albumina sérica em 200 passava normalmente para o CFS, que é considerado análogo à linfa. Também se tornou evidente que, para qualquer proteína dada, a razão de sua concentração no CFS e no soro segue uma função linear do raio molecular das moléculas em solução.

Existe um total de seis fontes de CFS que contém diferentes "barreiras". Sob condições normais e patológicas, as proteínas passam dessas fontes celulares ou teciduais para o CFS, sendo que ocorre variação do grau de filtração ou da taxa de síntese local, ou ambas variam.

A quantidade total de CFS constitui a soma algébrica dessas seis fontes (Fig. 41.1):

- **a barreira hematoencefálica** (os capilares do parênquima) dá origem a aproximadamente um terço do volume do CFS, e foi denominado fonte do líquido intersticial

- **a barreira sangue-CFS** fornece o volume do CFS (praticamente todos os dois terços remanescentes), denominado líquido coroidal, uma vez que ele é principalmente fornecido pelo plexo coroide (tufos capilares) localizado nos ventrículos laterais e, em menor grau, nos plexos localizados no terceiro e no quarto ventrículos

- **os gânglios da raiz dorsal** contêm capilares que possuem um grau muito maior de permeabilidade. Nos experimentos animais com azul de Evans, referido anteriormente, apesar de o encéfalo apresentar-se branco, as raízes dorsais apresentavam coloração azul, refletindo sua maior permeabilidade à albumina

- **o parênquima encefálico do SNC** produz diversas proteínas encefálicas específicas. Elas incluem a prostaglandina sintase (anteriomente chamada de proteína β residual), que apresenta um aumento de 11 vezes do plexo coroide até o saco lombar, e a transtiretina (uma proteína anteriormente chamada de pré-albumina, que é produzida localmente pelo plexo coroide), para a qual o inverso é verdadeiro: possui uma concentração relativa muito maior no ventrículo do que no CFS lombar

- **células circulantes do CFS**, principalmente os linfócitos dentro do SNC, sintetizam anticorpos locais; entretanto, existe uma forte presença de células imunossupressoras no SNC. Devido a isso, no caso de infecções encefálicas, como a meningite, esteroides são administrados em associação aos antibióticos para suprimir os efeitos potencialmente devastadores, dentro desse espaço confinado, da inflamação associada à resposta imune intratecal

- **as meninges** representam a sexta fonte de CFS sob condições patológicas; podem produzir aumentos drásticos nas concentrações das proteínas do CFS.

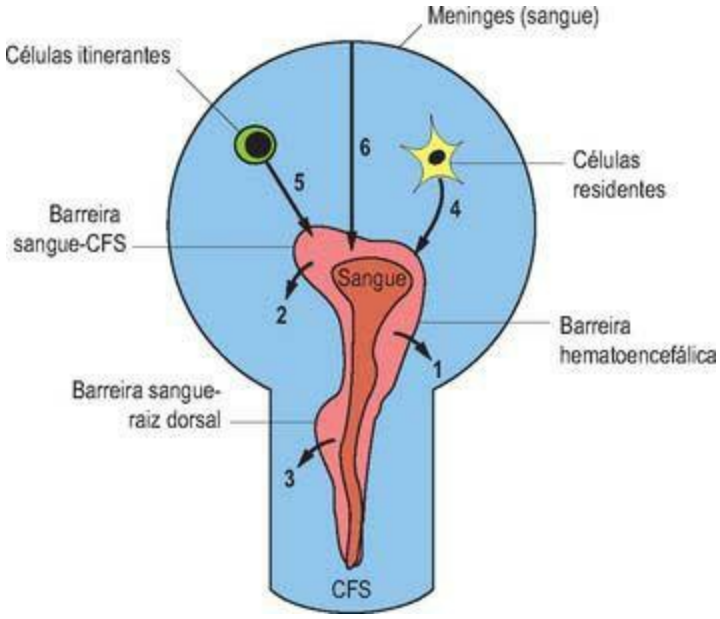


Fig. 41.1 As seis principais fontes de líquido cerebroespinhal (CFS). Os processos envolvidos compreendem a passagem através de barreiras (do sangue, isto é, 1, 2, 3) e fontes diretas de produção local (células do SNC, isto é, 4, 5, 6).

AS CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO

Menos de 10% das células do sistema nervoso correspondem a neurônios grandes. Os três principais tipos de células do sistema nervoso (cada um corresponde a aproximadamente 30%) são:

- **astrócitos**, que também fazem parte da barreira hematoencefálica
- **oligodendrócitos**, que são principalmente compostos de gordura e atuam como isolantes dos axônios
- **microglia**, que é essencialmente formada por macrófagos residentes captores (*scavengers*).

Esses diferentes tipos de células estão associados à s predominantes moléculas de proteínas que são importantes em diversas patologias encefálicas (Tabela 41.1). Outros constituintes secundários do sistema nervoso incluem as células ependimárias, que são células ciliadas secretoras de proteínas encefálicas específicas, como a prostaglandina sintase. As células endoteliais encefálicas também merecem consideração especial, já que, diferentemente de outros capilares teciduais, essas células contíguas são unidas por junções oclusivas, e acredita-se que essa característica também contribua para a barreira hematoencefálica, apesar de a membrana basal ser a principal fonte de peneiração molecular para as proteínas de tamanhos diferentes.

Tabela 41.1 As diferentes células do SNC e seus marcadores protei-cos indicando patologias encefálicas.

Células do SNC e marcadores para patologia encefálica

Célula	Proteína	Patologia
neurônio	enolase neurônio-específica	morte encefálica
astrócito	GFAP	placa (ou escara)
oligodendrócito	proteina básica de mielina	de/remielinização
microglia	ferritina	acidente vascular cerebral
plexo coroide	assialotransferrina	extravasamento do CFS (rinorreia)

GFAP, proteina glial fibrilar ácida.

LÍQUIDOS REGIONAIS NO ENCÉFALO: O EXTRAVASAMENTO DO CFS

Do ponto de vista clínico, é essencial fazer a distinção entre a rinorreia causada pelo CFS e as secreções nasais locais causadas, por exemplo, pela infecção por influenza. O cirurgião otorrinolaringologista deve saber se o líquido presente nessas secreções é proveniente do CFS, uma vez que qualquer extravazamento deve ser corrigido cirurgicamente, já que, ao contrário, ele permanece como uma fonte potencialmente crônica de meningite, como resultado da migração da flora nasal para o espaço subaracnoide. Uma proteína característica, que também é uma marcadora útil no CFS, é a assialotransferrina, uma transferrina que não possui ácido siálico. Na circulação sistêmica, essa ausência de ácido siálico fornece um sinal molecular para a reciclagem da proteína, que é imediatamente removida da circulação sistêmica por todas as células reticuloendoteliais. O encéfalo não possui células reticuloendoteliais verdadeiras ao longo da via do fluxo do CFS e, por isso, a assialotransferrina encontra-se em concentrações bastante elevadas. O humor aquoso da câmara anterior do olho produz a assialotransferrina característica, e a mesma assialotransferrina também pode ser encontrada na perilinfa dos canais semicirculares.

As características significativas dos neurônios são seu comprimento, suas muitas interconexões e o fato de que eles não se dividem após o nascimento

Existe uma noção arquetípica da atividade elétrica do sistema nervoso – em particular, da atividade elétrica dos neurônios. Entretanto, particularmente três outras características biológicas dos neurônios merecem destaque: seu comprimento, as interconexões prolíficas e o fato de eles não se dividirem após o nascimento. Além dessa última característica, muitos neurônios embrionários são destinados a morrer (por apoptose), já que eles não possuem órgãos-alvo após a vida embrionária. A existência das protuberâncias cervical e lombar da medula espinhal, é um reflexo da manutenção dos neurônios segmentados para os quais os órgãos-alvo eram, respectivamente, as mãos e os pés, o afilamento das demais posições é uma evidência da redução do diâmetro da medula devido à morte neuronal. Da mesma forma, a capacidade de memória e de aprendizagem indica a importância da plasticidade do sistema sináptico fornecida pelas extensas conexões inter- e intraneuronais.



O FERRO NO SNC

Durante o processo de maturação normal dos oligodendrócitos, que formam a bainha de mielina, o ferro parece ser importante, uma vez que ocorre aumento local das concentrações desse cátion e da proteína transferrina, que é necessária para ligar esse elemento (incluindo a forma asialo). Uma discrepância aparente entre as quantidades de ferro e as de transferrina é rapidamente explicada pela síntese local desta última, particularmente da forma asialo; grande quantidade de mRNA é encontrada nos oligodendrócitos e no plexo coroide.

Também ocorre síntese local de ferritina pelo SNC normal. O ferro livre pode apresentar um efeito particularmente tóxico no SNC e, por se ligar a ele, a ferritina mantém um estoque de ferro. Isso é claramente evidente no caso dos acidentes vasculares cerebrais, após os quais ocorre aumento drástico no local da síntese de ferritina, para que ela possa se ligar ao ferro liberado pela destruição dos eritrócitos (compare com a Figura 22.8).

Devido ao seu grande comprimento, os neurônios dependem de um sistema eficiente de transporte axonal

Os neurônios podem ser caracteristicamente de 1 m de comprimento; assim, o núcleo, a fonte de informação para a síntese de neurotransmissores, é em geral mais distante do terminal sináptico, o local de liberação desses transmissores. Por causa de sua longa extensão, uma necessidade crucial é a capacidade do neurônio de transportar material tanto do núcleo para a sinapse (transporte anterógrado) quanto da sinapse para o núcleo (transporte retrógrado). Os neurônios desenvolveram características especiais para lidar com a separação de seus dois sítios funcionais e a fim de manter a atividade elétrica nos nódulos de Ranvier (o restante do axônio é eletricamente silencioso durante o processo saltatório da condução elétrica) (Fig. 41.2).

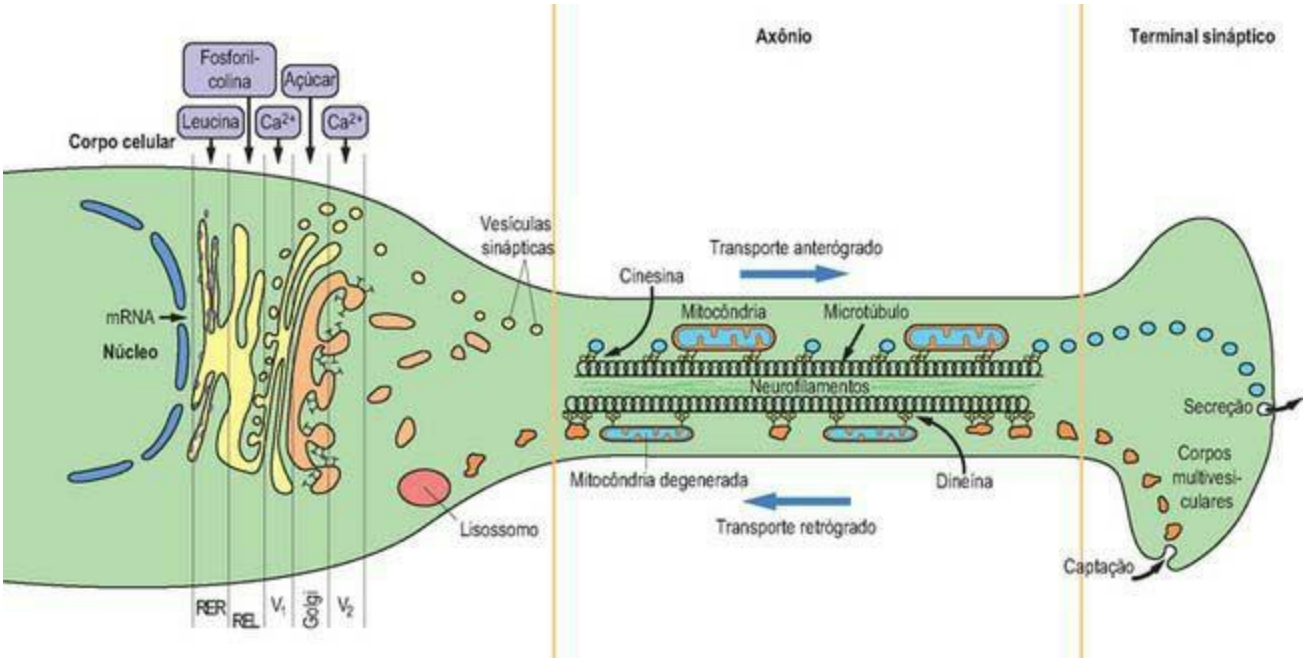


Fig. 41.2 A estrutura funcional de um neurônio. Dentro do corpo celular, existem movimentos especializados que, através do complexo de Golgi, são realizados pelos componentes necessários para a formação das vesículas sinápticas (V_1, V_2). No axônio, ocorre transporte axonal rápido ao longo dos microtúbulos por meio das proteínas móveis cinesina (no transporte anterógrado) ou dineína (no transporte retrógrado). RER, retículo endoplasmático rugoso; REL, retículo endoplasmático liso.

O movimento normal de "repouso" dentro do axônio é mediado por "motores" moleculares independentes (proteínas móveis): a cinesina, no caso de transporte anterógrado, e a dineína, no transporte retrógrado. Os elementos que são transportados em cada direção também diferem bastante, e os diferentes componentes da estrutura axonal, apresentados na Figura 41.2, são os responsáveis pelas diferentes velocidades de transporte (Tabela 41.2). Durante o crescimento, uma forma separada de transporte (em direção à sinapse) ocorre numa velocidade de aproximadamente 1 mm/dia, sendo que esse fluxo constitui o movimento maciço dos blocos da estrutura, como as proteínas filamentosas.

Tabela 41.2 As diferentes velocidades do transporte axonal.

Diferentes velocidades do transporte axonal		
Componente	**Velocidade) (mm/dia)**	**Estrutura e composição das substâncias transportadas**
Transporte rápido		
anterógrado	200-400	pequenas vesiculas, neurotransmissores, proteínas de membrana, lipídios
mitocôndria	50-100	mitocôndria
retrógrada	200-300	vesículas lisossômicas, enzimas
Transporte lento		
componente lento a	2-8	microfilamentos, enzimas metabólicas, complexo clatrina
componente lento b	0,2-1	neurofilamentos, microtubulos



AS CÉLULAS CIRCULANTES NO CFS: IMUNOLOGIA "REGIONAL"

Conforme mencionado no texto, o encéfalo é essencialmente um local imunologicamente "silencioso". Existe uma diferença de quase 10 vezes entre a proporção das células *helper* (CD4) e as células supressoras (CD8) no CFS, onde a razão é de 3:6, e a do parênquima encefálico, onde a razão é de 0:4, o que reflete uma preponderância das células supressoras no SNC (Cap. 38). Aproximadamente um terço das células do SNC é constituída de macrófagos residentes. Dentro do CFS, dois terços das células são linfócitos e o um terço restante é de macrófagos. Existem poucos vasos linfáticos no encéfalo propriamente dito, e o próprio CFS pode ser considerado como um análogo à linfa.

Estruturas neurogliais

Essencialmente, os astrócitos e os oligodendrócitos compreendem as estruturas neurogliais

No córtex ou na substância cinzenta, caracteristicamente, encontra-se um astrócito protoplasmático com um conjunto de prolongamentos circundando as células endoteliais, que, assim, auxiliam a "filtrar" as substâncias do sangue, e um conjunto separado de prolongamentos que circundam os neurônios, os quais são então "alimentados" com substâncias selecionadas que foram extraídas do sangue durante a passagem para os neurônios. Na substância branca, os astrócitos apresentam um aspecto bem mais fibroso e desempenham uma função mais estrutural. Sob condições patológicas onde há lesão do SNC, os astrócitos podem ter um papel importante na reação, sintetizando grande quantidade da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Essa é o equivalente celular de uma cicatriz tecidual e é encontrada em doenças como a esclerose múltipla, na qual é o principal constituinte das placas características da doença. Os astrócitos não são encontrados no SNP.

Os oligodendrócitos do SNC podem envolver em torno de 20 axônios, formando a bainha de mielina que isola esses prolongamentos neuronais uns dos outros e interrompe a comunicação cruzada entre os neurônios. Existe também intensa atividade mitocondrial dos oligodendrócitos nos nódulos de Ranvier, localizados paralelamente aos sítios de despolarização dentro do axônio subjacente. No SNP, as células de Schwann formam a mielina e possuem como característica o envolvimento de somente um único axônio. Como mencionado anteriormente, os constituintes químicos da bainha de mielina produzidos pelas células de Schwann e pelos oligodendrócitos são diferentes.

TRANSMISSÃO SINÁPTICA

Uma das características químicas exclusivas do encéfalo é a densidade extremamente elevada das sinapses entre os diferentes neurônios, nas quais um neuro-hormônio de ação local é liberado por um único axônio para muitos outros corpos celulares. Na terminação receptora, um determinado corpo celular, em geral, recebe inúmeros produtos celulares por meio de sua árvore dendrítica abundantemente ramificada: cada ramo pode ser encoberto por sinapses. O primeiro mensageiro químico ou "neurotransmissor" a atravessar a fenda sináptica é o neuro-hormônio, que é liberado pelo axônio da primeira célula para o dendrito da segunda célula. Essa ação é mediada por um receptor do neurotransmissor na célula responsiva. Normalmente, há um segundo mensageiro, como um nucleotídeo cíclico, que pode também levar a um terceiro mensageiro, como uma proteína fosforilada. Caracteristicamente, as proteínas G são encontradas imediatamente abaixo da proteína receptora do neurotransmissor, atravessando a membrana celular, onde eles atuam "acoplando" o primeiro mensageiro (p. ex., norepinefrina) a um segundo mensageiro (p. ex., AMP cíclico, cAMP) (Cap. 40).

Os neurotransmissores são normalmente inativados após suas ações pós-sinápticas na célula-alvo, sendo a hidrólise o principal mecanismo. O exemplo mais bem estudado é o da enzima acetilcolinesterase. Também pode haver um bloqueio ao nível do segundo mensageiro, como o cAMP, que é degradado pela enzima fosfodiesterase. Essa enzima é inibida pela cafeína e por outras metilxantinas, mimetizando, portanto, muitos dos efeitos dos neurotransmissores adrenérgicos.

A transmissão sináptica envolve a reciclagem dos componentes da membrana

Além da liberação de um neuro-hormônio específico, existe também um amplo sistema para a reciclagem dos constituintes da membrana associados a esse processo. As vesículas sinápticas contêm uma concentração muito alta do neurotransmissor de interesse, que está contido por uma membrana (Cap. 42). Durante a liberação sináptica do transmissor, ocorre a fusão da membrana da vesícula sináptica (contendo o neurotransmissor) com a membrana pré-sináptica. Esse aumento na massa total da membrana é corrigido pela invaginação das faces laterais dos terminais nervosos, onde um movimento de dobra para dentro da membrana é efetivado pelos movimentos contráteis da proteína clatrina. A partir daí, segue-se uma forma de pinocitose do excesso da membrana, que é transportada de maneira retrógrada em direção ao núcleo, para ser digerida pelos lisossomos.



UMA MULHER COM AMILOIDOSE

Uma mulher de 75 anos de idade queixa-se de tontura postural, boca seca, diarreia intermitente e dormência em ambos os pés. No exame clínico, foi observada importante redução da pressão sanguínea ao assumir a posição vertical. O raio X de tórax revelou lesões líticas no esterno. Sua urina continha proteína de Bence-Jones. Um exame da medula óssea demonstrou aumento do número das células plasmáticas (Cap. 4).

Comentário. Sua condição neurológica foi causada pela amiloidose, na qual o componente livre da cadeia leve de globulina do mieloma produzido pelo tumor das células plasmáticas na medula óssea se acumula nos nervos periféricos. As cadeias leves adotam a configuração de folhas β-pregueadas, com múltiplas cópias que são intercaladas e resistentes à proteólise normal.

Tipos de sinapses

Devido à grande diversidade de aferências sinápticas para um determinado neurônio, a soma algébrica final resulta em uma "decisão", ao nível do cone de implantação do axônio (local de origem do axônio a partir do corpo celular), em relação a transmitir ou não um potencial de ação ao longo do axônio como um fenômeno tudo-ou-nada. Entretanto, mesmo antes que essa decisão seja tomada, o estímulo de entrada de um determinado neurotransmissor pode basicamente ser classificado como excitatório ou inibitório.

Além de as decisões serem feitas em tempo relativamente curto em relação aos potenciais de ação (Cap. 42), existe uma modulação de longa duração do potencial de repouso da membrana, deslocando-o para mais perto (excitação) ou mais longe (inibição) do potencial crítico da membrana, que é o nível no qual o potencial de repouso da membrana irá finalmente disparar um potencial de ação no cone de implantação do axônio. Muitos fármacos, além do efeito de curta duração, têm um efeito prolongado na modulação, o que explica em parte seu efeito aditivo: isso pode ser observado em relação ao álcool ou aos fármacos opioides. Existem também efeitos prolongados durante o tratamento com vários fármacos, por exemplo, os utilizados no tratamento da depressão endógena, cujo efeito benéfico só aparece após semanas de uso.

Transmissão colinérgica

A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor que foi mais bem estudado. Como um sistema modelo, esse transmissor pode ter dois efeitos diferentes dependendo do local de origem no sistema nervoso (isto é, central ou periférico): os efeitos originariamente demonstrados pelos experimentos com nicotina são característicos do receptor nicotínico, enquanto os demonstrados com a muscarina caracterizam os receptores muscarínicos. Os desenvolvimentos recentes na farmacologia e na tecnologia do DNA produziram um panorama complexo dos agonistas e antagonistas associados à s ações regionais da ACh (Fig. 41.3). O antagonista clássico do efeito muscarínico é a atropina, e o bloqueador mais bem estudado para os receptores nicotínicos é um veneno de cobra, a α-bungarotoxina.

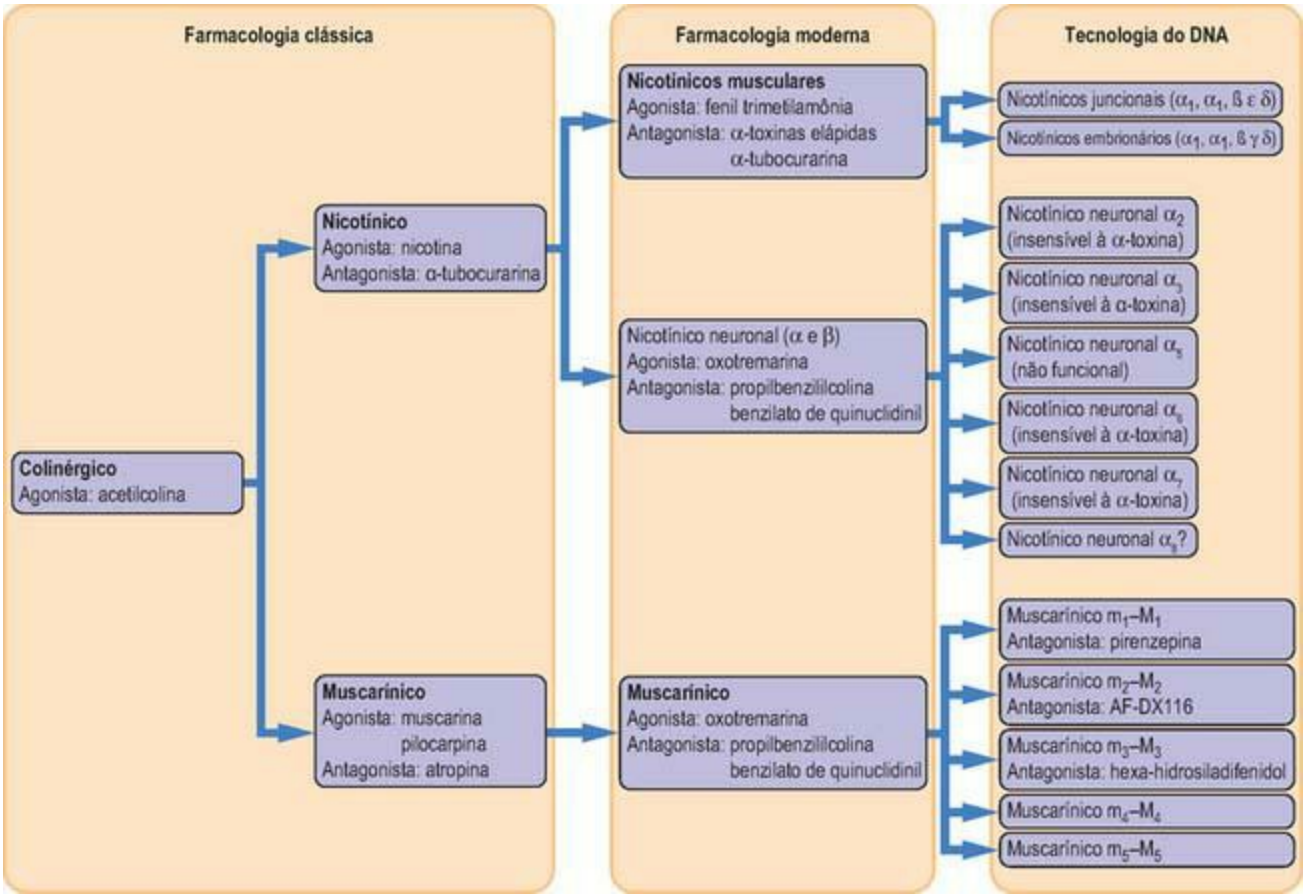


Fig. 41.3 A história da nomenclatura: agonistas e antagonistas de acetilcolina. As alterações da nomenclatura, dos termos inicialmente utilizados aos mais modernos, para os agonistas e os antagonistas das diferentes ações nas regiões centrais (neuronal) *versus* periférica (músculo) da acetilcolina (ACh).

ESCLEROSE MÚLTIPLA

É essencial fazer o diagnóstico de uma doença que apresenta epidódios de recidiva e de remissão, uma vez que o paciente pode não apresentar anormalidades no momento em que o médico realizar o exame físico. A punção lombar, portanto, tem um papel importante na demonstração de bandas oligoclonais no CFS, as quais estão ausentes na amostra de soro realizada em paralelo. Isso

significa que ocorre uma resposta imunológica intratecal em vez de sistêmica. O oposto é observado no caso, por exemplo, da neurossarcoidose, em que as imunoglobulinas sintetizadas sistemicamente são transferidas passivamente para o CFS, originando um padrão chamado de "espelho", onde as bandas oligoclonais são as mesmas, tanto no CFS quanto no soro. O exame envolve focalização isoelétrica do CFS com uma amostra de soro em paralelo. As imunoglobulinas separadas são expostas ao anti-IgG para identificar as bandas que estão presentes no CFS, mas ausentes do soro correspondente. Esses padrões indicam a síntese local de IgG no encéfalo.

Na miastenia grave, os autoanticorpos são formados contra o receptor nicotínico para ACh. Entretanto, pelo bloqueio da hidrólise da ACh, por exemplo através do fármaco edrofônio (que inibe a enzima hidrolítica acetilcolinesterase), pode-se efetivamente aumentar a concentração de ACh (Cap. 42).

Transmissão adrenérgica

Após a ACh, a epinefrina e a norepinefrina são os neurotransmissores mais estudados. Mais uma vez, possuem têm dois diferentes receptores:

- receptor α-adrenérgico, bloqueado pela fentolamina
- receptor β-adrenérgico, bloqueado pelo propranolol.

CANAIS IÔNICOS

Defeitos dos canais de sódio

Diferentes lesões moleculares nos diversos sítios dos poros do canal de sódio podem originar uma paralisia periódica hipercalêmica. Como esse nome sugere, o paciente apresenta fraqueza muscular intermitente, com aumento da concentração de potássio sérico nesses períodos. Isso é causado por um desequilíbrio dos movimentos catiônicos, nos quais o sódio penetra na célula e o potássio sai. Nesses pacientes, o fluxo anormal de sódio no músculo não é corretamente regulado pelo contrafluxo de íons potássio (Cap. 8).

Este último fármaco costuma ser o mais utilizado pelos cardiologistas (muitos outros β-bloqueadores são os fármacos de escolha no tratamento da doença cardíaca coronariana), porém os neurologistas também o utilizam como parte do tratamento da doença de Parkinson. Essa doença resulta de uma deficiência de dopamina, o precursor da epinefrina e da norepinefrina. Muitos efeitos adrenérgicos são promovidos pelo cAMP, mas outros neurotransmissores têm efeitos excitatórios ou inibitórios (Cap. 42).

CANALOPATIAS: JOVEM DE 18 ANOS DE IDADE COM FRAQUEZA MUSCULAR

Um jovem de 18 anos de idade acordou durante a noite com fraqueza intensa dos músculos proximais de seus braços e pernas. Antes de se recolher ele se alimentou com massa e bolo. Seu irmão e seu pai já haviam apresentado anteriormente um quadro semelhante. Ele foi levado para a sala de emergência do hospital local, onde foi observado que os membros com fraqueza estavam hipotônicos, com depressão do reflexo dos tendões. A concentração sérica de potássio estava levemente reduzida a 2,9 mmol/L (normal 3,5-5,5). No dia seguinte, ele se recuperou completamente, e o potássio sérico aumentou espontaneamente até os níveis normais. Outro ataque de paralisia foi induzido por uma infusão intravenosa de glicose confirmando, assim, o diagnóstico de paralisia periódica familiar.

Comentário. A paralisia periódica hipocalêmica é herdada de forma mendeliana dominante e resulta de uma mutação no gene que codifica o canal de cálcio do tipo L. As doenças genéticas que afetam a função do canal iônico são chamadas de canalopatias (Cap. 8).

Mesmo em repouso, o neurônio trabalha para bombear íons ao longo dos gradientes iônicos

O neurônio "em repouso" está, todavia, continuamente bombeando sódio para fora e potássio para dentro da célula, através de canais iônicos. Durante um potencial de ação, ocorre uma reversão momentânea desses movimentos iônicos, de tal forma que o sódio entra na célula e o potássio sai, repolarizando efetivamente a membrana em repouso (Cap. 8). As mutações dos canais de sódio podem ocorrer em diferentes sinos e originam a paralisia periódica hipercalêmica. O íon negativo, cloreto, se move através de canais independentes, os quais estão implicados em estados patológicos específicos, como a miotonia.

Os íons cálcio possuem uma função importante na sincronização da atividade neuronal

O movimento dos íons cálcio no interior das células fornece com frequência um "gatilho" para as células sincronizarem uma atividade, como a liberação sináptica do neurotransmissor. Essa sincronização dos movimentos também parece ter uma função importante no retículo sarcoplasmático do músculo (Cap. 20). Um exemplo de mimetismo molecular no interior do sistema nervoso central é a síndrome de Lambert-Eaton, uma doença que afeta predominantemente os canais de cálcio do subtipo P/Q. O paciente pode ter um carcinoma avenocelular (*oat cell*) primário do pulmão, e o sistema imunológico responde formando anticorpos contra essas células malignas. Entretanto, a malignidade e os canais de cálcio possuem um epítopo comum, cujo efeito é o bloqueio da liberação do neurotransmissor pelo terminal pré-sináptico causada pela resposta imunológica. Esse efeito é análogo, contudo pode ser claramente distinto, da miastenia grave, onde o bloqueio é pós-sináptico.



BOTULISMO: UMA MULHER COM VISÃO TURVA E DISFAGIA

Vinte e quatro horas após comer vegetais em conserva, uma jovem saudável apresentou início progressivo de visão turva, vômitos graves, disfagia e fraqueza progressiva dos membros, com início nos ombros. Seu médico a internou no hospital, e os exames eletrofisiológicos confirmaram o diagnóstico clínico de botulismo. Foi feita a administração imediata de antissoro trivalente, feito de toxina inativa, e, com a ajuda de ventilação assistida, a paciente se recuperou em poucas semanas.

Comentário. Os vegetais continham uma exotoxina do microrganismo anaeróbico *Clostridium botulinum*, que não foi destruída durante o processo de preservação. A toxina hidrolisa as proteínas pré-sinápticas envolvidas na liberação do neurotransmissor e, assim, o bloqueio é semelhante à lesão funcional na síndrome miastênica de Lambert-Eaton; entretanto, no botulismo, o bloqueio pode ser letal, especialmente se atingir o músculo frênico, que é essencial para o movimento pulmonar respiratório apropriado.

Também é importante destacar que o bloqueio da liberação pré-sináptica do neurotransmissor pode ser explorado, de forma útil, pela aplicação terapêutica da toxina botulínica (uma proteína derivada de bactéria anaeróbica), a qual contém enzimas que hidrolisam as proteínas pré-sinápticas envolvidas na liberação dos neurotransmissores. Essa toxina é utilizada em casos especiais de espasticidade, como nos torcicolos, nos quais os pacientes podem apresentar um alívio do excesso de contratura dos músculos do pescoço que torcem a cabeça cronicamente para um lado, causando

dor e desconforto se não tratado.

O MECANISMO DA VISÃO

O mecanismo pelo qual o olho humano pode detectar um único fóton de luz é um excelente exemplo dos processos químicos subjacentes à função neuronal. Esse processo envolve a captura de fótons e o efeito transdutor pelo qual a energia da luz é convertida em uma forma química, que é, enfim, transmutada em um potencial de ação por um neurônio ganglionar da retina. Ainda não se conhece precisamente os diversos intermediários, porém a hipótese subjacente é que a proteína receptora, a rodopsina, seja acoplada à proteína G. Existem diversas sequências homólogas entre a rodopsina e os receptores β-adrenérgicos e os muscarínicos de ACh. As principais etapas ocorrem na seguinte ordem (Fig. 41.4)

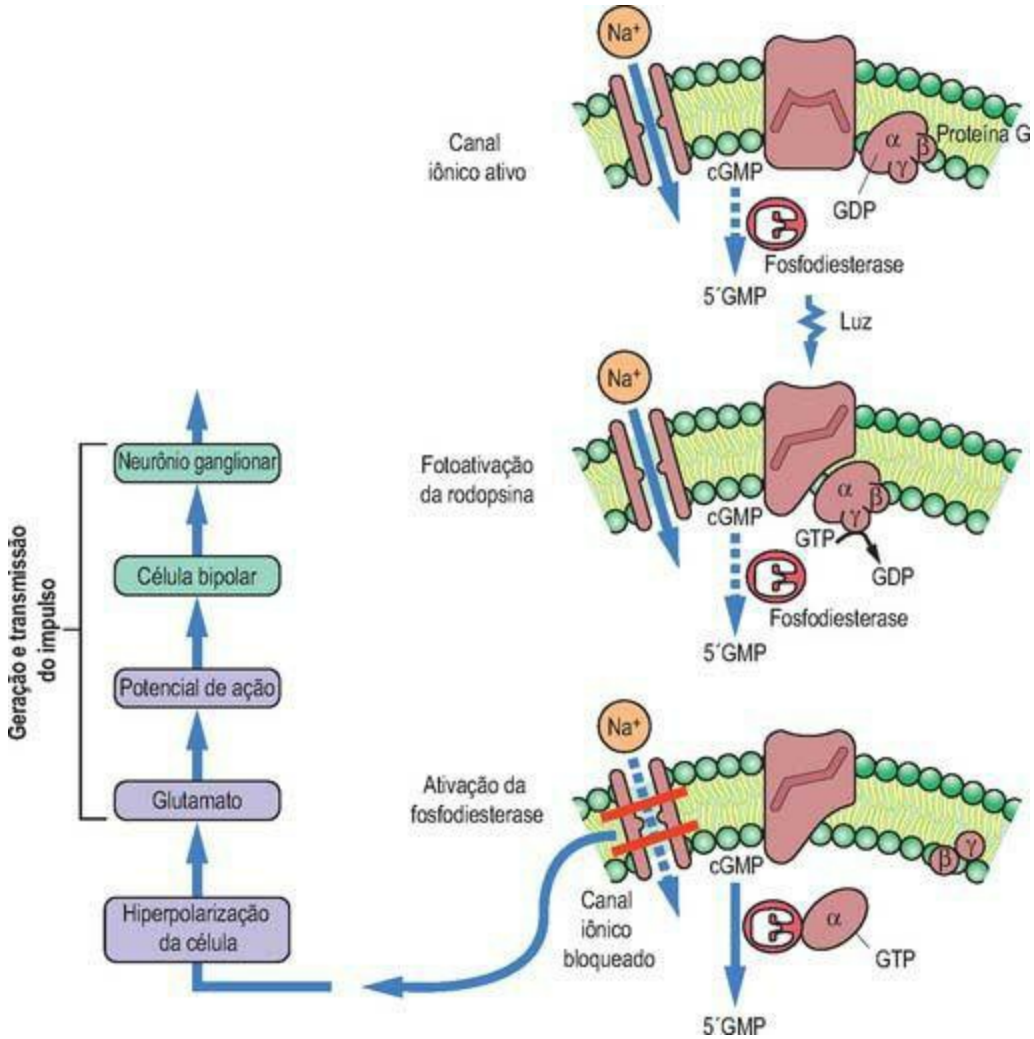


Fig. 41.4 Neuroquímica da transmissão sináptica no mecanismo da visão. A figura mostra as consequências da fotoativação da rodopsina por meio do acoplamento à proteína G em uma célula bastonete. A fosfodiesterase é ativada e hidrolisa o segundo mensageiro, o cGMP, bloqueando assim a entrada de sódio e causando hiperpolarização da célula. Em geral, as etapas pelas quais os neurotransmissores dão seguimento à produção do potencial de ação no neurônio ganglionar final não são conhecidas em detalhes. Compare o receptor acoplado à proteína G (Fig. 40.2).

- O *cis*-retinal é convertido em *trans*-retinal.

- A rodopsina se torna ativada.
- O nível de cGMP diminui.
- A entrada de Na^+ é bloqueada.
- As células bastonetes são hiperpolarizadas.
- Ocorre a liberação de glutamato (ou aspartato).
- Um potencial de ação despolariza a célula bipolar adjacente.
- Este último evento despolariza o neurônio ganglionar associado para enviar um potencial de ação para fora do olho.

Resumo

- O sistema nervoso contém diversos tipos de células, sendo que cada qual sintetiza suas próprias proteínas individuais.

- As funções especializadas do sistema nervoso confirmam que essas proteínas são efetivamente compartimentalizadas em locais diferentes.

- Para facilitar a comunicação no interior do encéfalo, existem dois métodos especializados de movimentação das células, das organelas e das proteínas: o líquido cerebroespinhal e o transporte axonal.

- A barreira hematoencefálica é diversa em relação à sua origem anatômica e não é absoluta, mas relativa (especificamente baseada no tamanho molecular).

- A síntese de anticorpos no CFS, mas não paralelamente no soro, é uma evidência inequívoca de que o encéfalo pode ser fonte de estimulação antigênica.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. As proteínas G são amplamente utilizadas em todo o organismo como agentes de "acoplamento" entre o primeiro mensageiro extracelular e o segundo mensageiro intracelular. Discuta algumas das diferentes funções pelas quais a proteína G foi adaptada entre os diferentes tipos de células.

2. A mitocôndria possui o importante papel de suprir as necessidades metabólicas para a atividade elétrica nos nódulos de Ranvier ao longo de considerável extensão do axônio. Discuta o papel dos dois motores moleculares na reciclagem da mitocôndria necessários para a sustentação dessa função.

3. O cloreto é um ânion importante e que participa, durante a despolarização, de movimentos complexos com outros cátions, tais como o sódio e o potássio. Discuta como as anormalidades congênitas nesses transportadores de ânions podem dar origem a atividades anormais dependentes dos potenciais de ação.

4. Discuta como o encéfalo pode produzir um "gradiente" para diferentes proteínas ao longo do eixo rostrocaudal.

5. Descreva as reações na visão que ilustram como a luz é convertida em alterações no fluxo de íons.

6. Dê um exemplo de mimetismo molecular.

Leituras sugeridas

Barry DM, Millecamps S, Julien JP, Garcia ML. New movements in neurofilament transport, turnover and disease. *Exp Cell Res*. 2007;313:2110-2120.

Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*. 2007;129:865-877.

Cannon SC. Physiologic principles underlying ion channelopathies. *Neurotherapeutics*. 2007;4:174-183.

de Leon MJ, Mosconi L, Blennow K, et al. Imaging and CSF studies in the preclinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1097:114-145.

Stein-Streilein J, Taylor AW. An eye's view of T regulatory cells. *J Leukoc Biol*. 2007;81:593-598.

Neurotransmissores

S. Heales

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Delinear os critérios que devem ser preenchidos para que uma molécula seja classificada como um neurotransmissor.

- Identificar os principais tipos de neurotransmissores e estar ciente de que, apesar de algumas moléculas possuírem propriedades neurotransmissoras, elas não podem, no sentido exato, ser classificadas como neurotransmissores.

- Explicar a geração dos potencias de ação, avaliar como os neurotransmissores podem ser excitatórios ou inibitórios e resumir o processo pelo qual um neurotransmissor é liberado da célula pré-sináptica.

- Descrever os diferentes tipos de receptores de neurotransmissores e seu mecanismo de ação geral.

- Descrever as principais vias bioquímicas envolvidas na síntese e na degradação do neurotransmissor.

- Identificar alguns distúrbios clínicos que podem surgir como resultado do comprometimento do metabolismo do neurotransmissor.

INTRODUÇÃO

Os neurotransmissores são moléculas que atuam como sinalizadores químicos entre as células nervosas

As células nervosas se comunicam umas com as outras e com os tecidos-alvo por meio da secreção de mensageiros químicos, chamados de neurotransmissores. Este capítulo descreve as diversas classes de neurotransmissores e como eles interagem com suas células-alvo. Discutiremos seus efeitos no organismo, como as alterações em sua sinalização podem causar uma doença e como a manipulação farmacológica de suas concentrações pode ser usada terapeuticamente.

DEFINIÇÃO DE NEUROTRANSMISSOR

Tradicionalmente, para que uma molécula seja rotulada como neurotransmissor, alguns critérios devem ser preenchidos:

- A síntese da molécula deve ocorrer no interior do neurônio, isto é, todas as enzimas de síntese, os substratos, os cofatores etc. devem estar presentes para a síntese *de novo*.

- O armazenamento da molécula ocorre no interior do terminal nervoso, (p. ex., nas vesículas sinápticas, antes de sua liberação).

- A secreção da molécula do terminal pré-sináptico ocorre em resposta a um estímulo apropriado, como um potencial de ação.

- Há ligação e reconhecimento da suposta molécula de neurotransmissor na célula pós-sináptica-alvo.

- Existência de mecanismos para a inativação e o término da atividade biológica do neurotransmissor.

O preenchimento rigoroso desses critérios significa que algumas moléculas que estão envolvidas na comunicação entre os neurônios não são, *stricto sensu*, classificadas como neurotransmissores. Assim, o óxido nítrico (NO), a adenosina, os neuroesteroides, as poliaminas etc. são com frequência denominados neuromoduladores em vez de neurotransmissores.

CLASSIFICAÇÃO DOS NEUROTRANSMISSORES

A Tabela 42.1 apresenta a classificação dos neurotransmissores baseada na composição química. Muitos são derivados de compostos simples, como os aminoácidos (Tabela 42.2), mas atualmente os peptídeos também são considerados de extrema importância. Os principais transmissores no sistema nervoso periférico são a norepinefrina e a acetilcolina (ACh) (Fig. 42.1; compare com a Figura 41.3).

Tabela 42.1 Classificação dos neurotransmissores. Os neurotransmissores podem ser classificados de diversas formas. O esquema mostrado baseia-se nas semelhanças químicas. Todos, exceto os peptídios, são sinteti-zados no terminal nervoso, onde são empacotados em vesículas. Os pepti-dios são sintetizados no corpo celular e transportados ao longo do axônio.

Classificação dos neurotransmissores	
Grupo	**Exemplos**
aminas	acetilcolina (ACh), norepinefrina, epinefrina, dopamina, 5-HT
aminoácidos	glutamato, GABA
purinas	ATP, adenosina
gases	óxido nítrico
peptídios	endorfinas, taquicininas, muitos outros

5-HT, 5-hidroxitríptamina; GABA, ácido γ-aminobutirico.

Tabela 42.2 Os neurotransmissores de baixo peso molecular. Muitos neurotransmissores são compostos simples e de baixo peso molecular, frequentemente derivados de aminoácidos comuns.

Neurotransmissores de baixo peso molecular		
Composto	**Fonte**	**Local de produção**
Aminoácidos		
glutamato		sistema nervoso central (SNC)
aspartato		SNC
glicina		medula espinhal
Derivados de aminoácidos		
GABA	glutamato	SNC
histamina	histidina	hipotálamo
norepinefrina	tirosina	nervossimpáticos, SNC
epinefrina	tirosina	medula adrenal e alguns nervos do SNC
dopamina	tirosina	SNC
5-HT	triptofano	SNC, células intestinais enterocromafins, nervos entéricos
Purinas		
ATP		nervos sensoriais, entéricos, simpáticos
adenosina	ATP	SNC, nervos periféricos
Gás		
óxido nítrico	arginina	trato geniturinário, SNC
Miscelânea		
ACh	colina	nervos parassimpáticos, SNC

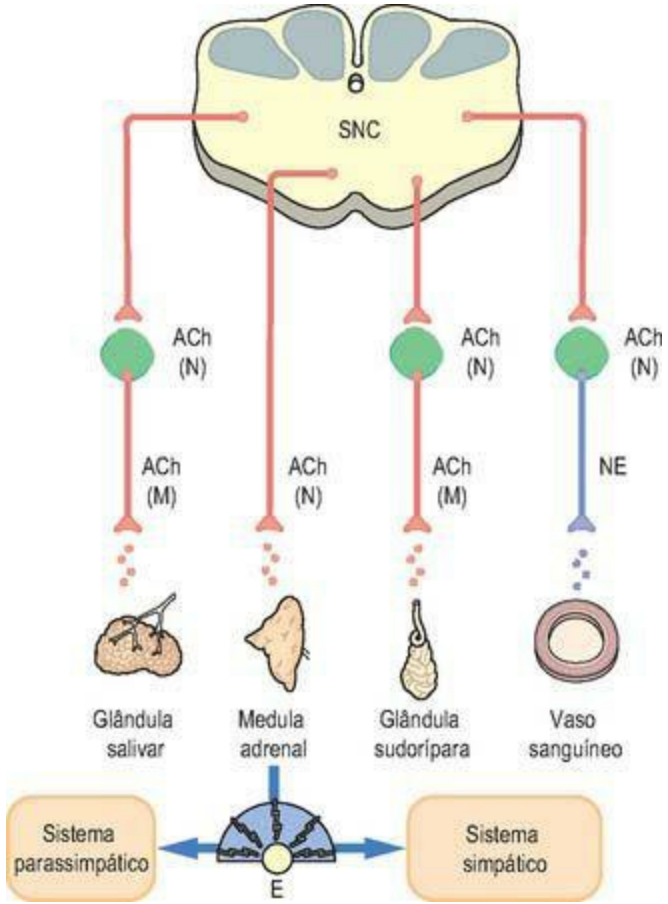


Fig. 42.1 Os transmissores no sistema nervoso autônomo. As catecolaminas e a acetilcolina são transmissores do sistema nervoso simpático e do parassimpático. Todos os nervos pré-ganglionares secretam ACh, que se liga aos receptores nicotínicos (N). A maioria dos nervos pós-ganglionares simpáticos secreta norepinefrina (NE), enquanto os nervos pós-ganglionares parassimpáticos liberam ACh, que age em receptores muscarínicos (M). Os neurônios motores liberam ACh, que age em diferentes receptores nicotínicos. E, epinefrina (Fig. 41.3).

Diversos transmissores podem ser encontrados em um nervo

Um dogma antigo da função nervosa dizia que um nervo continha um único neurotransmissor. Entretanto, atualmente se sabe que isso é uma simplificação exagerada e que a combinação de transmissores é a regra. O padrão dos transmissores celulares pode caracterizar um papel funcional particular, porém detalhes disso ainda são obscuros. Um transmissor importante, de baixo peso molecular, como uma amina, frequentemente está presente junto com diversos peptídios, um aminoácido e uma purina. Algumas vezes, pode até mesmo haver mais de um possível transmissor em uma determinada vesícula, como se acredita que seja o caso do trifosfato de adenosina (ATP) e da norepinefrina nos nervos simpáticos. Em alguns casos, a intensidade do estímulo pode controlar qual transmissor será secretado, sendo que, frequentemente, os peptídios requerem maiores níveis de estímulo. Além disso, os diferentes transmissores podem apresentar sua ação em uma escala de tempo diferenciada. Os nervos simpáticos são bons exemplos de nervos que se encaixam nesse caso: acredita-se que o ATP provoque sua rápida excitação, enquanto a norepinefrina e o neuropeptídio Y (NPY) sejam responsáveis por uma fase mais lenta de ação. Em muitos tecidos, o NPY por si só pode ser capaz de produzir uma excitação muito lenta.

NEUROTRANSMISSÃO

Os potenciais de ação são causados pelas alterações no fluxo de íons através das membranas celulares

O sinal transmitido por uma célula nervosa reflete uma alteração abrupta na diferença de potencial de voltagem através da membrana celular. A diferença normal do potencial de repouso é de poucos milivolts, com o interior da célula sendo negativo, causado por um desequilíbrio iônico através da membrana plasmática: a concentração do íon K^+ é maior no interior do que no exterior das células, enquanto o oposto é verdadeiro para os íons Na^+. Essa diferença é mantida pela ação da Na^+/K^+-ATPase (Caps. 23 e 41). Somente aqueles íons para os quais a membrana é permeável podem afetar o potencial, já que eles podem atingir um estado eletroquímico estável sob a influência combinada das diferenças de concentração e de voltagem. Como as membranas em todas as células em repouso são comparativamente permeáveis ao íon K^+ como resultado da presença dos canais de K^+ independentes de voltagem (vazamento), esse íon controla o potencial de repouso.

Uma alteração na voltagem, que tende a direcionar o potencial de repouso em direção ao zero, a partir da voltagem negativa normal, é conhecida como despolarização, enquanto um processo que aumenta o potencial negativo é chamado de hiperpolarização

Até agora, esse quadro é comum a todas as células. Entretanto, as células nervosas contêm canais de sódio dependentes de voltagem que se abrem rapidamente quando uma alteração despolarizante na voltagem é aplicada. Quando eles se abrem, permitem a entrada de grande quantidade de íons Na^+, provenientes do líquido extracelular (Fig. 42.2), que alteram o potencial de repouso e direcionam o potencial de membrana a valores positivos. Essa reversão de voltagem é o potencial de ação. Quase imediatamente, os canais de sódio se fecham e os canais de potássio denominados tardios se abrem. Esse mecanismo restaura o balanço iônico normal de repouso ao longo da membrana e, após um curto período refratário, a célula pode conduzir outro potencial de ação. Nesse meio-tempo, o potencial de ação se espalhou por condutância elétrica para o segmento seguinte da membrana nervosa, e o ciclo completo novamente se inicia.

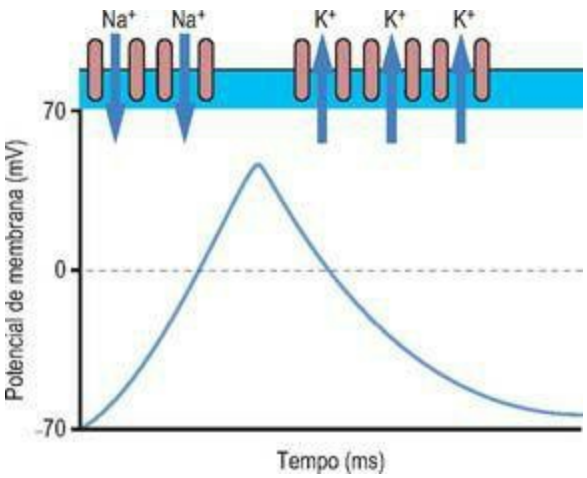


Fig. 42.2 Geração do potencial de ação. O potencial de ação é formado da seguinte forma. No início do potencial de ação, a membrana está no potencial de repouso de aproximadamente −70 mV. Esse potencial é mantido pelos canais de K^+ independentes de voltagem. Quando um impulso é iniciado por um sinal de um neurotransmissor, os canais de Na^+ dependentes de voltagem se abrem.

Isso permite o influxo de íon Na^+, que altera o potencial de membrana para valores positivos. Os canais de Na^+ então se fecham, e os canais de K^+, chamados de canais retificadores tardios, se abrem para restaurar o balanço inicial dos íons e o potencial de membrana negativo.

Os neurotransmissores alteram a atividade de vários canais iônicos levando a alterações do potencial de membrana

Os neurotransmissores excitatórios causam uma alteração despolarizante na voltagem e, nesse caso, é mais provável ocorrrer um potencial de ação. Por outro lado, os transmissores inibitórios hiperpolarizam a membrana, o que diminui a probabilidade de um potencial de ação ocorrer.

Os neurotransmissores atuam em sinapses

Os neurotransmissores são secretados no espaço entre as células em uma área especializada conhecida como sinapse (Fig. 42.3). No caso mais simples, os neurotransmissores se difundem da membrana pré-sináptica para o espaço ou fenda sináptica e se ligam aos receptores na membrana pós-sináptica. Entretanto, muitos neurônios, particularmente os que contêm aminas, possuem diversas varicosidades ao longo do axônio contendo transmissores. Essas varicosidades podem não estar próximas a nenhuma célula vizinha, de tal forma que o neurotransmissor liberado a partir delas pode afetar muitos neurônios. Os nervos que inervam a musculatura lisa geralmente são desse tipo.

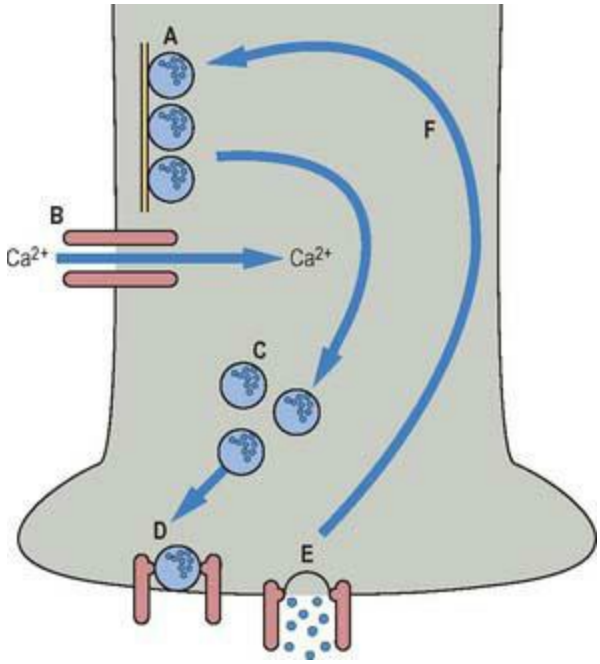


Fig. 42.3 Secreção dos neurotransmissores. Os neurotransmissores são secretados das vesículas na membrana sináptica. (A) No estado de repouso, as vesículas encontram-se ligadas aos microtúbulos. (B) Quando um potencial de ação é recebido, os canais de cálcio se abrem. (C) As vesículas se movem para a membrana plasmática e (D) ligam-se a um complexo de proteínas de ancoragem. (E) O neurotransmissor é secretado e (F) as vesículas são recicladas.

Quando o potencial de ação chega no final do axônio, a alteração da voltagem leva à abertura dos canais de cálcio. A entrada de cálcio é essencial para a mobilização das vesículas contendo o transmissor e para sua fusão com a membrana sináptica e secreção a partir dela.

Devido aos transmissores serem secretados das vesículas, os impulsos chegam na célula pós-sináptica em "pacotes" individuais ou quanta. Na junção neuromuscular entre os nervos e as células

da musculatura esquelética, grande quantidade de vesículas é descarregada de uma vez e, assim, um único impulso pode ser suficiente para estimular a contração da célula muscular. Entretanto, o número de vesículas liberadas nas sinapses entre os neurônios é muito menor; consequentemente, a célula receptora será estimulada somente se a soma algébrica total dos diversos estímulos positivos e negativos exceder o limiar. Como cada célula no encéfalo recebe aferências de um grande número de neurônios, isso implica maior capacidade para controle fino das respostas no sistema nervoso central (SNC) do que a existente na junção neuromuscular.

Receptores

Os neurotransmissores atuam ligando-se a receptores específicos e abrindo ou fechando canais iônicos

Existem vários mecanismos pelos quais os receptores para os neurotransmissores excitatórios podem causar a propagação de um potencial de ação em um neurônio pós-sináptico. Direta ou indiretamente, eles causam alterações no fluxo iônico através da membrana, até que o potencial atinja o ponto crítico, ou limiar, para a iniciação de um potencial de ação. Os receptores que controlam diretamente a abertura de um canal iônico são chamados de ionotrópicos, enquanto os receptores metabotrópicos causam alterações em sistemas de segundos mensageiros que, por sua vez, alteram a função de canais que são separados do receptor.

Receptores ionotrópicos (canais iônicos)

Os receptores ionotrópicos contêm um canal iônico no interior de sua estrutura (Fig. 42.4; Cap. 8). Os exemplos incluem o receptor nicotínico de ACh e alguns receptores de glutamato e do ácido γ-aminobutírico (GABA). Esses receptores são proteínas transmembrana com várias subunidades, geralmente cinco, cincundando o poro através da membrana. Cada subunidade possui quatro regiões transmembrana. Quando o ligante se liga, ocorre uma alteração na estrutura tridimensional do complexo, que permite o fluxo de íons através dele. O efeito no potencial de membrana depende de quais íons têm permitissão de passar pelo canal: os receptores nicotínicos de ACh são relativamente não específicos para sódio e potássio e causam despolarização, enquanto o receptor $GABA_A$ é um canal de cloreto e causa hiperpolarização.

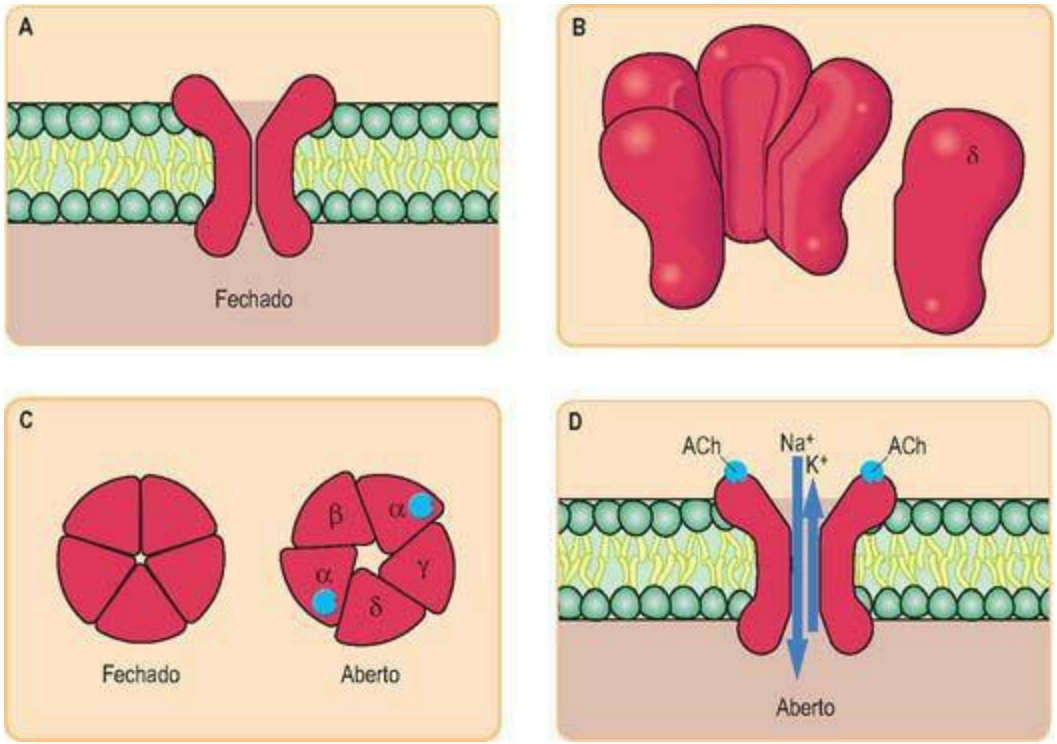


Fig. 42.4 O mecanismo de ação dos receptores ionotrópicos. Os receptores ionotrópicos abrem diretamente os canais iônicos (de fato, eles próprios são canais iônicos). O exemplo mais bem estudado é o receptor nicotínico de ACh. Esse receptor é uma proteína

transmembrana (A) consistindo em cinco subunidades não idênticas (B), cada uma cruzando diretamente a membrana. As subunidades circundam um poro (C) que permite a passagem seletiva de determinados íons quando é aberto por um ligante (D).

Receptores metabotrópicos

Todos os receptores metabotrópicos conhecidos são acoplados à s proteínas G

Os receptores metabotrópicos são acoplados à s vias de segundos mensageiros e agem mais lentamente do que os receptores ionotrópicos. Todos os receptores metabotrópicos conhecidos são acoplados à s proteínas G (Cap. 40) e, da mesma forma que os receptores de hormônios, têm sete regiões transmembrana. Normalmente, esses receptores estão acoplados à adenilil ciclase, alterando a produção de adenosina monofosfato cíclica (cAMP), ou à via do fosfatidilinositol, que altera o fluxo de cálcio. Canais iônicos que são separados do receptor são normalmente modificados pela fosforilação. Por exemplo, o receptor β-adrenérgico, que responde à norepinefrina e à epinefrina (Fig. 13.5), causa um aumento do cAMP, que estimula uma quinase a fosforilar e ativar um canal de cálcio. Alguns dos receptores muscarínicos da ACh têm efeitos semelhantes nos canais de K^+.

Regulação dos neurotransmissores

A ação dos transmissores é interrompida por meio da sua remoção da fenda sináptica

Quando os transmissores terminam sua função, eles devem ser removidos do espaço sináptico. A difusão simples é provavelmente o principal mecanismo de remoção dos neuropeptídios. Enzimas como as acetilcolinesterases, que clivam a ACh, podem destruir qualquer transmissor remanescente. Os neurotransmissores excedentes podem também ser captados pelo neurônio pré-sináptico para serem reutilizados, e essa é a maior rota de remoção de catecolaminas e aminoácidos. A interferência n a captura causa um aumento na concentração do transmissor na fenda sináptica, o que frequentemente tem consequências terapêuticas úteis.

As concentrações dos neurotransmissores podem ser manipuladas

Os efeitos dos neurotransmissores podem ser alterados pela modificação de suas concentrações efetivas ou pela alteração no número de receptores. As concentrações podem ser modificadas por:

- alterações na velocidade de síntese
- alterações na taxa de liberação na sinapse
- bloqueio da recaptação
- bloqueio da degradação

As modificações no número de receptores podem estar envolvidas em adaptações de longo prazo à administração dos fármacos.

CLASSES DE NEUROTRANSMISSORES

Aminoácidos

Provar que os aminoácidos são verdadeiros neurotransmissores é uma tarefa particularmente difícil. Como os aminoácidos estão presentes em altas concentrações, em razão de suas funções metabólicas, a simples dosagem de suas concentrações não é uma evidência conclusiva. Os estudos farmacológicos de respostas a diferentes análogos e a clonagem de receptores específicos forneceram a prova definitiva.

Glutamato

O glutamato é o principal transmissor excitatório no SNC

O glutamato age tanto em receptores ionotrópicos quanto metabotrópicos. Clinicamente, o receptor caracterizado *in vitro* pela ligação do *N*-metil-D-aspartato (NMDA) é particularmente importante (Fig. 42.5).

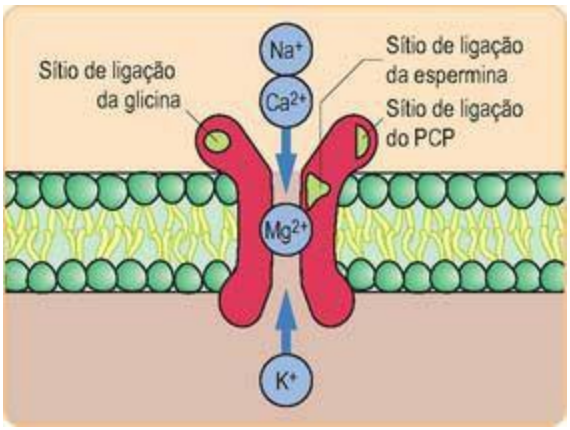


Fig. 42.5 O receptor NMDA de glutamato. O receptor de glutamato que liga o *N*-metil-D-aspartado (NMDA) é complexo. Esse receptor é clinicamente importante, já que ele pode causar dano aos neurônios após o acidente vascular (excitotoxicidade). Ele contém diversos sítios de ligação modulatórios, de tal forma que é possível o desenvolvimento de fármacos que podem alterar sua função. A glicina é um cofator obrigatório, da mesma forma que as poliaminas, como a espermina. O magnésio bloqueia fisiologicamente o canal no potencial de repouso, de modo que o canal pode abrir somente quando a célula foi parcialmente despolarizada por um estímulo independente. O magnésio, portanto, prolonga a excitação. Esse receptor também se liga à fenciclidina (PCP). Como essa droga de abuso pode causar sintomas psicóticos, é possível que uma disfunção das vias envolvendo os receptores NMDA cause alguns dos sintomas da esquizofrenia.

O hipocampo (Fig. 42.6) é uma área do sistema límbico do encéfalo que está envolvida na emoção e na memória. Determinadas vias sinápticas do hipocampo tornam-se mais ativas quando estimuladas cronicamente, um fenômeno conhecido como potencialização de longo prazo. Isso representa um modelo possível para explicar a fixação da memória e requer a ativação do receptor NMDA e o consequente influxo de cálcio.

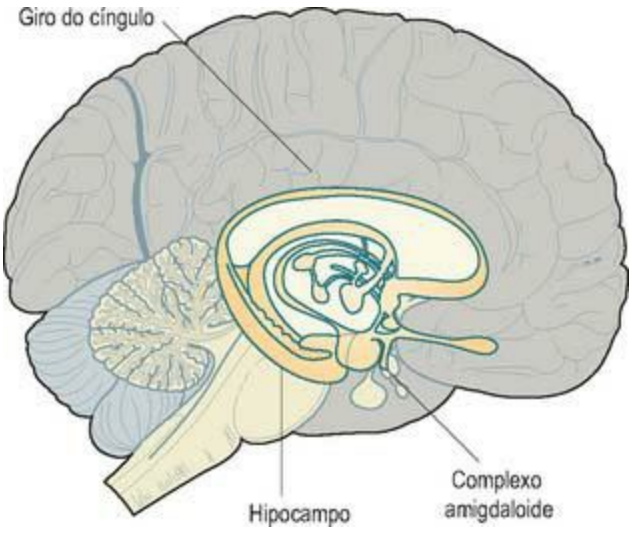


Fig. 42.6 O sistema límbico. O sistema límbico do encéfalo está envolvido nas emoções e na memória. Ele consiste em várias áreas que circundam o tronco encefálico superior, incluindo o hipocampo, o corpo amigdaloide e o giro do cíngulo. A remoção do hipocampo impede a fixação da memória de curta duração, enquanto a função amigdaloide intacta é necessária para a sensação de medo.

O glutamato é reciclado por transportadores de alta afinidade no interior dos neurônios e de células gliais. As células gliais convertem o glutamato em glutamina, que depois retorna por difusão para o interior do neurônio. A glutaminase mitocondrial no neurônio regenera o glutamato para reutilização.

Glutamato e excitotoxicidade

A concentração extracelular de glutamato aumenta após trauma e acidente vascular, durante convulsões graves e em algumas doenças encefálicas orgânicas, como a coreia de Huntington, a demência associada à AIDS e a doença de Parkinson. Esse aumento é devido à liberação de glutamato a partir das células danificadas e pelo dano das vias de recaptação de glutamato.

O excesso de glutamato é tóxico para as células nervosas

A ativação do receptor NMDA permite a entrada de cálcio nas células, o que ativa diversas proteases que, por sua vez, iniciam as vias de morte celular programada ou apoptose (Cap. 43). Além disso, podem ocorrer alterações em outros receptores ionotrópicos de glutamato que também causam captura anormal de cálcio. A captura dos íons sódio também está envolvida e causa o inchamento das células. A ativação dos receptores NMDA também aumenta a produção de óxido nítrico que, por si só, pode ser tóxico. A morte celular em alguns modelos de excitotoxicidade pode ser prevenida com o uso de inibidores da produção de óxido nítrico, porém não está claro qual o mecanismo dessa toxicidade.

Estão sendo realizados esforços almejando o desenvolvimento de fármacos que inibem a ativação do receptor NMDA e que suprimem a excitotoxicidade. Espera-se, assim, que o dano causado pelo acidente vascular possa ser limitado ou até revertido. Infelizmente, muitos desses fármacos apresentam efeitos adversos, uma vez que eles se ligam ao sítio de ligação da fenciclidina e resultam em efeitos psicológicos desagradáveis, como paranoia e alucinações.

O ácido γ-aminobutírico (GABA)

O GABA é sintetizado a partir do glutamato pela enzima glutamato descarboxilase

O GABA (Fig. 42.7) é o principal transmissor inibitório do encéfalo. São conhecidos dois receptores de GABA: o receptor $GABA_A$, que é ionotrópico, e o $GABA_B$, que é metabotrópico. O receptor $GABA_A$ consiste em cinco subunidades provenientes de diversas famílias de genes, o que gera um grande número de receptores com diferentes afinidades de ligação. Esse receptor é o alvo de diversos importantes fármacos utilizados na terapêutica. Os benzodiazepínicos, por exemplo, se ligam ao receptor $GABA_A$ e potencializam a resposta do GABA endógeno; assim, esses fármacos reduzem a ansiedade e também causam relaxamento muscular. Os barbitúricos também se ligam ao receptor GABA e o estimulam diretamente, mesmo na ausência de GABA. Em função dessa falta de dependência do ligante endógeno, esses agentes têm maior probabilidade de causar efeitos tóxicos

colaterais no caso de sobredosagem.

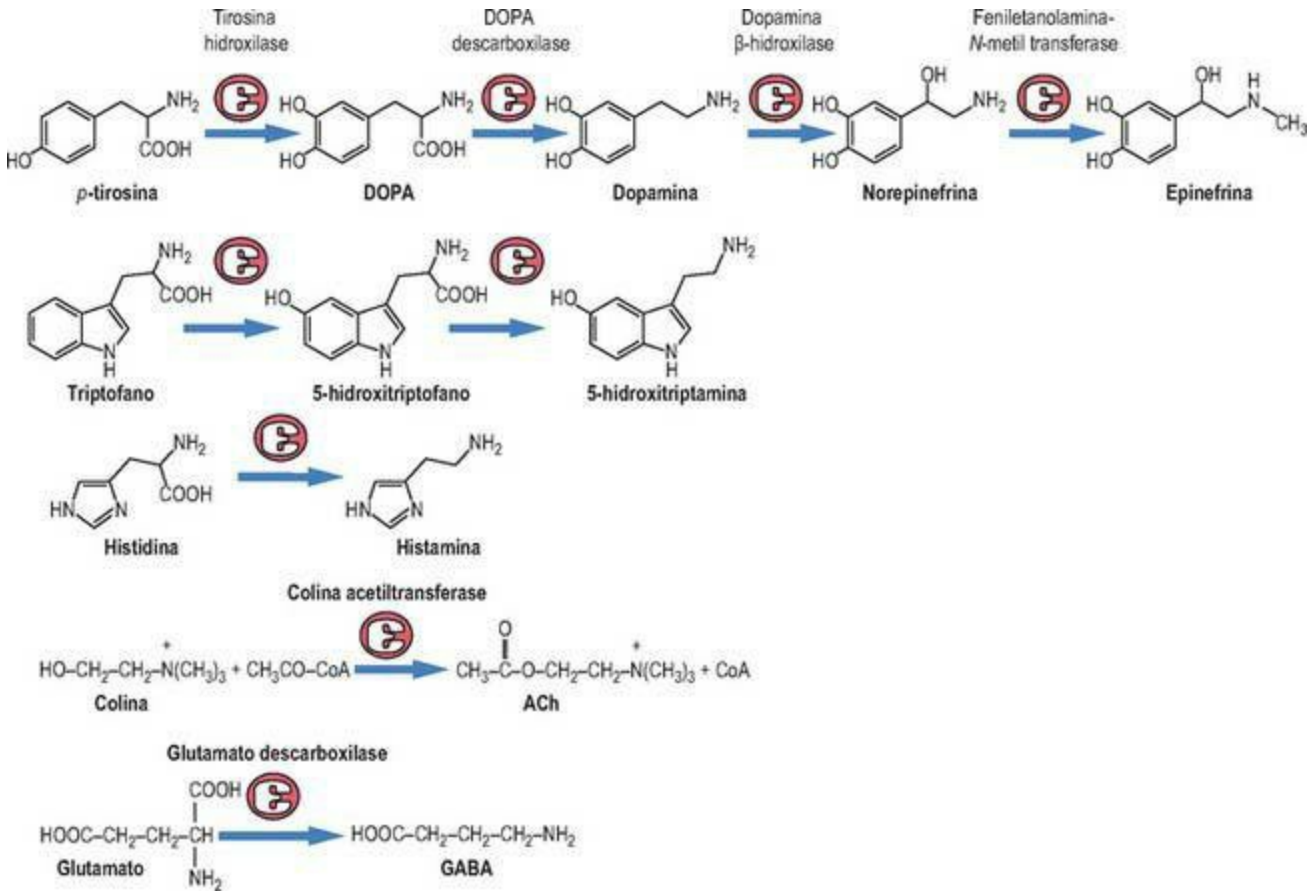


Fig. 42.7 A síntese dos neurotransmissores. As vias de síntese dos neurotransmissores são simples.

Glicina

A glicina é principalmente encontrada nos interneurônios inibitórios da medula espinhal, onde bloqueia os impulsos que migram ao longo da medula para os neurônios motores que estimulam o músculo esquelético. O receptor de glicina nos neurônios motores é ionotrópico e é bloqueado pela estricnina, que permite a propagação dos impulsos sem um controle negativo, que contribuem para a rigidez e as convulsões causadas por essa toxina.

DISTÚRBIOS DA NEUROTRANSMISSÃO: DEPRESSÃO COMO UMA DOENÇA DOS NEUROTRANSMISSORES AMINA

Os inibidores da monoamina oxidase (MAO) previnem o catabolismo das catecolaminas e da serotonina. Portanto, eles aumentam as concentrações desses compostos na sinapse e aumentam a ação dos transmissores. Os compostos com essa propriedade são os antidepressivos. A reserpina, um fármaco anti-hipertensivo que depleta as catecolaminas, causa depressão e não é mais utilizada. Assim, esses achados deram origem à "teoria aminérgica da depressão", que estabelece que a depressão é causada por uma deficiência relativa de aminas neurotransmissoras nas sinapses centrais e preconiza que os fármacos que aumentam as concentrações das aminas podem melhorar os sintomas

dessa condição.

Corroborando essa teoria, temos os antidepressivos tricíclicos, que inibem o transporte tanto de norepinefrina quanto de serotonina para o interior dos neurônios, aumentando assim a concentração de aminas na fenda sináptica. Os inibidores específicos da recaptação de serotonina (SSRI), como a fluoxetina (Prozac®), também são antidepressivos muito eficazes. Entretanto, como os sintomas da depressão somente melhoram alguns dias após o início do tratamento, acredita-se que adaptações a longo prazo das concentrações dos transmissores e de seus receptores sejam pelo menos tão importantes quanto as alterações agudas nas concentrações das aminas na fenda sináptica.

Esse papel das monoaminas na depressão é, sem dúvida, uma supersimplificação. Como exemplo dessa simplificação, citamos a cocaína, que também é um inibidor eficaz da recaptação, porém não tem ação antidepressiva, e as anfetaminas, que tanto bloqueiam a recaptação quanto estimulam a secreção das catecolaminas dos terminais nervosos, causando mania em vez de melhorar a depressão.

Catecolaminas

A norepinefrina, a epinefrina e a dopamina, conhecidas como catecolaminas, são derivadas do aminoácido tirosina (Fig. 42.7). Em comum com outros compostos que contêm grupos amina, como a serotonina, elas também são conhecidas como aminas biogênicas. Os nervos que liberam as catecolaminas têm varicosidades ao longo do axônio, em vez de uma única área de secreção na extremidade. O transmissor é secretado a partir das varicosidades e se difunde através do espaço extracelular até que encontre um receptor. Isso permite que o transmissor afete uma grande área do tecido, e acredita-se que esses compostos possuam um efeito modulatório geral nas funções cerebrais gerais, como o humor e o alerta.

Norepinefrina e epinefrina

A norepinefrina (também conhecida como noradrenalina) é o principal transmissor no sistema nervoso simpático. Os nervos simpáticos originam-se na medula espinhal e correm para os gânglios situados perto da medula, a partir dos quais nervos pós-ganglionares correm para o tecido-alvo. A norepinefrina é o transmissor para esses nervos pós-ganglionares, enquanto a ACh é o transmissor no gânglio intermediário. A estimulação desses nervos é responsável por diversas características da resposta de luta ou fuga, como estimulação da frequência cardíaca, sudorese, vasoconstrição na pele e broncodilatação.

Também existem neurônios contendo norepinefrina no SNC, principalmente no tronco encefálico (Fig. 42.8). Seus axônios se estendem em uma ampla rede por todo o córtex e alteram o estado geral de alerta ou atenção. Os efeitos estimulatórios das anfetaminas são causados por sua grande semelhança química com as catecolaminas.

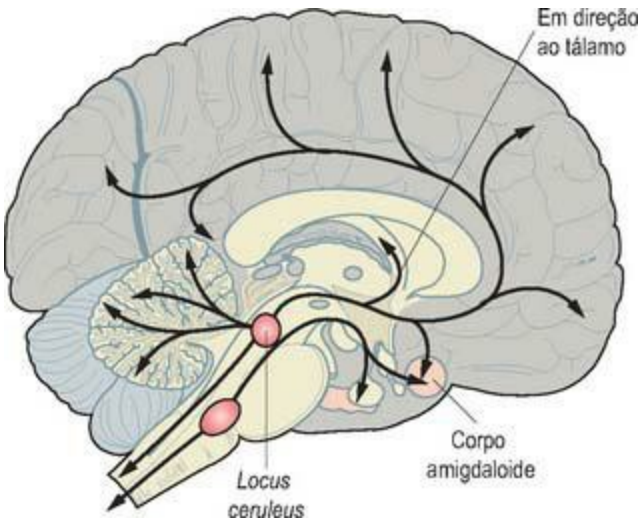


Fig. 42.8 Os neurônios de norepinefrina no SNC. Os neurônios que contêm norepinefrina se originam no *locus ceruleus*, no tronco encefálico, e se distribuem por todo o córtex.

A epinefrina (também conhecida como adrenalina) é produzida pela medula adrenal sob influência dos nervos que contêm ACh análogos aos nervos pré-ganglionares simpáticos. A

epinefrina é mais ativa do que a norepinefrina no coração e nos pulmões, causa redirecionamento do sangue da pele para o músculo esquelético e tem efeitos estimulatórios importantes no metabolismo do glicogênio no fígado. Em resposta à epinefrina, um suprimento extra de glicose é disponibilizado para o músculo, sendo que o coração e os pulmões trabalham mais intensamente para bombear oxigênio pela circulação, e o organismo está então preparado para correr ou para se defender (Cap. 21). No entanto, a epinefrina não é essencial para a vida, uma vez que é possível remover a medula adrenal sem consequências graves.

Os receptores para norepinefrina e epinefrina são chamados de adrenoceptores (Fig. 13.5). Com base na sua farmacologia, eles são divididos em classes e subclasses de receptores do tipo α e β. A epinefrina atua em todas as classes de receptores, porém a norepinefrina é mais específica para os receptores do tipo α. Os β-bloqueadores, como o atenolol, são utilizados no tratamento da hipertensão e da dor no peito (angina) na doença cardíaca isquêmica, uma vez que eles antagonizam os efeitos estimulatórios das catecolaminas no coração. Os α-bloqueadores inespecíficos têm uso limitado, apesar de os α_1-bloqueadores mais específicos, como o prazosin, e os α_2-bloqueadores, como a clonidina, podem ser utilizados na hipertensão. Certas subclasses de receptores do tipo β são encontradas em determinados tecidos. Por exemplo, o receptor β_2 está presente nos pulmões, e os agonistas desse receptor, como o salbutamol, são, portanto, utilizados na produção da dilatação brônquica na asma, sem a estimulação do receptor-β_1 do coração.

UMA REAÇÃO INCOMUM AO QUEIJO

Um homem de 50 anos de idade sofre de depressão há algum tempo. Sua condição foi tratada com tranilcipromina, um inibidor da monoamina oxidase dos tipos A e B. Ele desenvolveu uma cefaleia grave e latejante, e sua pressão sanguínea era de 200/110 mmHg. A única ocorrência incomum foi a sua participação em um coquetel, na noite anterior, no qual ele comeu salgadinhos com queijo e bebeu diversos copos de vinho tinto.

Comentário. O paciente apresentou uma crise hipertensiva causada pela interação entre o alimento ingerido e o fármaco que ele vinha recebendo – um inibidor da MAO. Esse fármaco inibe a principal enzima que cataboliza as catecolaminas. Diversos alimentos, incluindo queijos, arenque em conserva e vinho tinto, contêm uma amina chamada tiramina, que possui estrutura semelhante à dos transmissores aminérgicos naturais e também é catabolizada pela MAO. Se essa enzima não é funcional, as concentrações de tiramina aumentam e ela começa a atuar como um neurotransmissor. Isso pode causar uma crise hipertensiva, conforme ocorreu nesse paciente.

FEOCROMOCITOMA: UM NEUROTRANSMISSOR COMO CAUSA DE HIPERTENSÃO

Uma mulher de 56 anos de idade apresenta hipertensão grave, com crises de sudorese, cefaleia e palpitações. Sua hipertensão não respondeu ao tratamento com inibidor da enzima conversora de angiotensina e diurético. Foi feita coleta de uma amostra de urina para a quantificação de catecolaminas e metabólitos. A taxa de excreção de norepinefrina foi de 1.500 nmol/24 h (253 mg/24 h) (faixa de referência < 900 nmol/24 h, < 152 mg/24 h), a de epinefrina foi de 620 nmol/24 h (113

mg/24 h) (faixa de referência < 230 nmol/24 h, < 42 mg/24 h) e a do ácido vanilmandélico foi de 60 mmol/24 h (11,9 mg/24 h) (faixa de referência < 35,5 mmol/24 h, [< 7,0 mg/24 h]) (Figura 42.9).

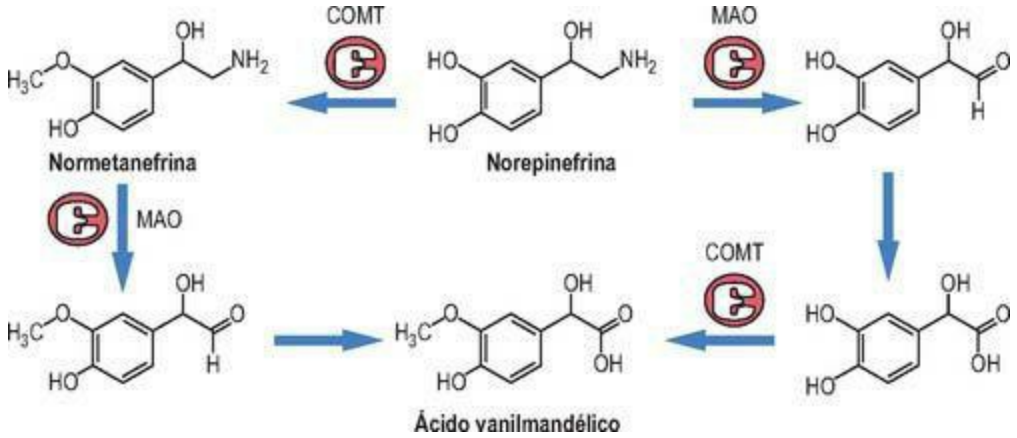


Fig. 42.9 O catabolismo das catecolaminas. As catecolaminas são degradadas por oxidação do grupo amino pela enzima monoamina oxidase (MAO) e por metilação pela catecol-*O*-metil transferase (COMT). A via apresentada é referente à norepinefrina, mas as vias para epinefrina, dopamina e 5-HT são análogas.

Comentário. A paciente tem um feocromocitoma, que é um tumor da medula adrenal que secreta catecolaminas. Tanto a norepinefrina quanto a epinefrina podem ser secretadas: a norepinefrina causa hipertensão pela ativação dos adrenoceptores do tipo α_1 no músculo liso vascular, e a epinefrina aumenta a frequência cardíaca pela ativação dos adrenoceptores do tipo β_1 no músculo cardíaco. A hipertensão pode ser paroxística e grave, levando ao acidente vascular ou à parada cardíaca.

O diagnóstico é feito quantificando-se as catecolaminas no plasma ou na urina, ou de seus metabólitos, como as metanefrinas e o ácido vanilmandélico, na urina. O tumor geralmente pode ser localizado por meio de técnicas radiológicas, como a ressonância magnética nuclear (RMN) ou por tomografia computadorizada (TC).

Apesar de ser uma causa rara de hipertensão, correspondendo somente a 1% dos casos, é muito importante que ela seja lembrada, uma vez que é uma condição perigosa, e frequentemente responde ao tratamento cirúrgico.

A norepinefrina é captada pelas células por um transportador de alta afinidade e catabolizada pela enzima monoamina oxidase (MAO). Ocorrem, a seguir, reações de oxidação e de metilação pela catecol-*O*-metil transferase (COMT) que convertem esses produtos em metanefrinas e em ácido vanilmandélico (ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico) (Fig. 42.9), os quais podem ser quantificados na urina como índice da função da medula adrenal. Esses compostos estão particularmente aumentados em pacientes portadores de tumor da medula adrenal, conhecido como feocromocitoma. Esse tumor causa hipertensão devido à ação vasoconstritora das catecolaminas produzidas por ele.

Dopamina

A dopamina é tanto um intermediário na síntese de norepinefrina quanto um neurotransmissor. É um importante neurotransmissor em nervos que interconectam os núcleos dos gânglios basais no cérebro e o controle do movimento voluntário (Fig. 42.10). Os danos nesses nervos causam a doença de Parkinson, a qual é caracterizada por tremor e dificuldade no início e no controle dos movimentos. A

dopamina também é encontrada em vias que afetam o sistema límbico do encéfalo, o qual está envolvido nas respostas emocionais e na memória. Alterações no sistema dopaminérgico estão envolvidas na esquizofrenia, uma vez que muitos fármacos antipsicóticos utilizados no tratamento dessa doença ligam-se aos receptores de dopamina.

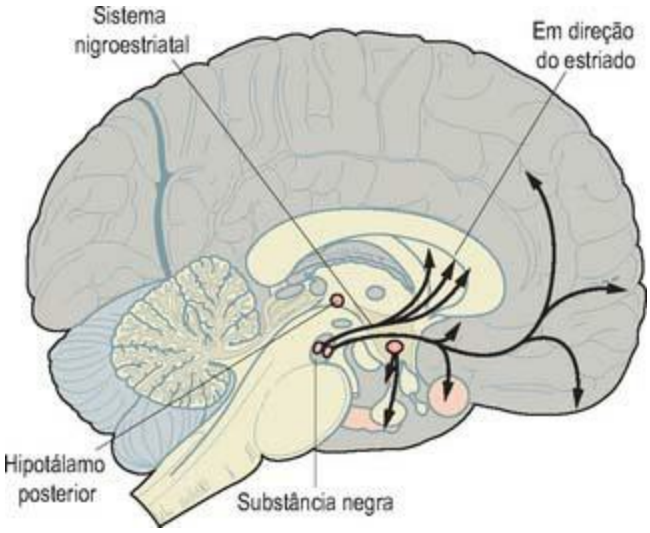


Fig. 42.10 A dopamina no trato nigroestriatal. Os nervos contendo dopamina correm em tratos bem definidos. Um dos tratos mais importantes é o nigroestriatal, que conecta a substância negra no mesencéfalo aos núcleos basais abaixo do córtex. Dano nessa via causa a doença de Parkinson, com perda do controle fino dos movimentos.

Na periferia, a dopamina causa vasodilatação e é, portanto, utilizada clinicamente para estimular o fluxo sanguíneo renal, sendo importante no tratamento da falência renal (Cap. 23). O catabolismo da dopamina é comparável ao da norepinefrina, entretanto o principal metabólito formado é o ácido homovanílico (HVA).

Serotonina (5-hidroxitriptamina)

A serotonina, também chamada de 5-hidroxitriptamina (5-HT), é derivada do triptofano (Fig. 42.7). Além disso, a biossíntese de serotonina tem várias semelhanças bioquímicas com a síntese da dopamina. Dessa forma, a triptofano hidroxilase, assim como a tirosina hidroxilase, têm necessidade do cofator tetra-hidrobiopterina (BH_4) (ver a seguir). Além disso, o 5-hidroxitriptofano é convertido em serotonina pela dopa descarboxilase (também conhecida como aminoácido aromático descarboxilase).

Os neurônios serotoninérgicos concentram-se nos núcleos da rafe, no tronco encefálico superior (Fig. 42.11), porém se projetam para cima, em direção ao córtex cerebral, e para baixo, para a medula espinhal. Esses neurônios são mais ativos quando os indivíduos estão acordados do que quando estão dormindo, e a serotonina pode controlar o grau de responsividade dos neurônios motores na medula espinhal. Além disso, a serotonina também está envolvida nos chamados comportamentos vegetativos, como alimentação, comportamento sexual e controle da temperatura.

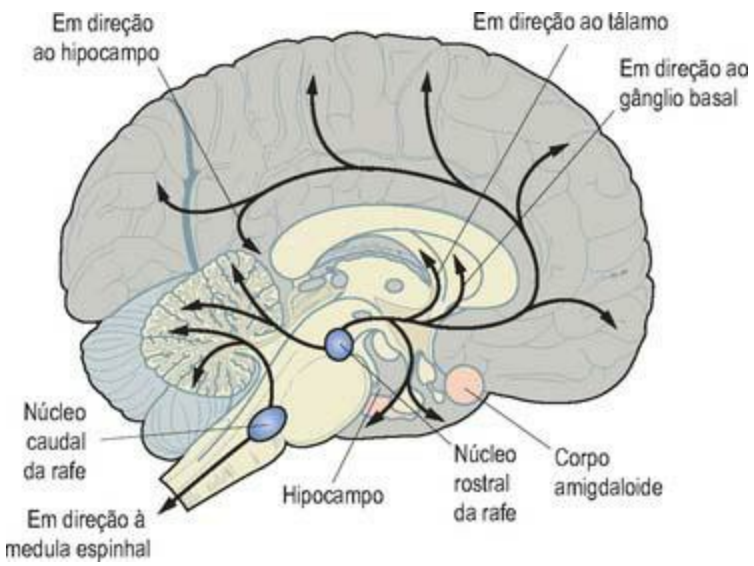


Fig. 42.11 Os nervos serotoninérgicos no SNC. Os nervos que contêm serotonina se originam no núcleo da rafe, parte da formação reticular do tronco encefálico superior. Em comum aos nervos que contêm norepinefrina, eles são amplamente distribuídos.

Acetilcolina

A acetilcolina (ACh) é o transmissor do sistema nervoso autônomo parassimpático e dos gânglios simpáticos (Fig. 41.3). A estimulação do sistema parassimpático produz geralmente efeitos opostos aos do sistema simpático, como redução da frequência cardíaca, broncoconstrição e estimulação da musculatura lisa do intestino. A ACh também atua na junção neuromuscular, na qual os nervos motores fazem contato com as células da musculatura esquelética e causam sua contração. Além dessas funções, a ACh pode estar envolvida nos processos de aprendizado e de memória, uma vez que os neurônios contendo esse transmissor também estão presentes no encéfalo.

A ACh é sintetizada a partir da colina pela enzima colina acetiltransferase. Após ser secretada na fenda sináptica, a ACh é amplamente quebrada pela acetilcolinesterase. O restante é captado pela célula nervosa por transportadores semelhantes aos das aminas.

Existem duas classes principais de receptores de ACh: os nicotínicos e os muscarínicos (Cap. 41, Fig. 41.3). Ambos respondem à ACh, porém podem ser distinguidos por meio de seus agonistas e antagonistas, uma vez que eles são estruturalmente bem diferentes e diferem em relação aos seus mecanismos de ação.

- **Os receptores nicotínicos são ionotrópicos.** Esses receptores ligam a nicotina e são encontrados nos gânglios e na junção neuromuscular. Quando a ACh ou a nicotina se liga a esse receptor, um canal se abre, permitindo a passagem tanto de Na^+ quanto de K^+. Por ser direta a ação do ligante no canal, a ação é rápida.

- **Os receptores muscarínicos, que respondem à toxina fúngica muscarina, são metabotrópicos.** Esses receptores são bem mais disseminados no encéfalo do que os receptores nicotínicos, e são também os principais receptores encontrados no músculo liso e nas glândulas, que recebem inervação dos nervos parassimpáticos. A atropina inibe especificamente esses receptores. Existem vários receptores muscarínicos independentes, que diferem em relação à sua distribuição tecidual e vias de sinalização. Até o momento, não se tem claro nenhum padrão a respeito de suas funções específicas.

DEFICIÊNCIAS DA TIROSINA HIDROXILASE E DO AMINOÁCIDO AROMÁTICO DESCARBOXILASE: CAUSAS HEREDITÁRIAS DE PREJUÍZO DO METABOLISMO DE AMINAS BIOGÊNICAS

A tirosina hidroxilase é o primeiro passo da biossíntese da dopamina, e os distúrbios hereditários que afetam a atividade dessa enzima levam à deficiência de dopamina no encéfalo. Diversos fenótipos clínicos foram descritos, incluindo um distúrbio de marcha progressivo e parkinsonismo infantil. O tratamento da deficiência da tirosina hidroxilase é feito pela administração de L-dopa. Com o objetivo de prevenir a descarboxilação da L-dopa em dopamina no sangue (pela aminoácido aromático descarboxilase periférica, AADC), um inibidor (que não afeta a atividade da enzima AADC encefálica) é administrado junto com a L-dopa. Essa inibição otimiza o transporte de L-dopa através da barreira hematoencefálica. No interior do encéfalo, a AADC pode então converter a L-dopa em dopamina.

A AADC catalisa a conversão da L-dopa em dopamina e do 5-hidroxitriptofano em serotonina. Consequentemente, um erro inato do metabolismo afetando a atividade dessa enzima resulta em uma deficiência encefálica tanto de dopamina quanto de serotonina. Os pacientes com deficiência de AADC têm um quadro clínico que inclui grave distúrbio do movimento, movimentos oculares anormais e prejuízo neurológico. O tratamento da deficiência da AADC consiste na prevenção da degradação de qualquer dopamina e serotonina que possa ser produzida pela atividade residual da AADC, isto é, pelo uso dos inibidores da monoamina oxidase. Além disso, os agonistas da dopamina, como a pergolida e a bromocriptina, são utilizados para "mimetizar" os efeitos da dopamina.



DEFICIÊNCIA DE FOSFATO DE PIRIDOXAL: UMA CAUSA DA EPILEPSIA NEONATAL

O fosfato de piridoxal (PLP), a forma biologicamente ativa da vitamina B_6 (Cap. 11), é utilizado como cofator por mais de 100 enzimas, incluindo as reações catalisadas pela aminoácido aromático descarboxilase (AADC), pela treonina desidratase e pelo sistema de clivagem de glicina. A vitamina B_6 está presente no organismo humano como diversos vitâmeros que são precursores do PLP. Uma enzima importante na formação do PLP é a piridox(am)ina-5′-fosfato oxidase (PNPO). Essa enzima catalisa a conversão dos precursores do fosfato de piridoxina e fosfato de piridoxamina em PLP. A deficiência de PNPO leva à diminuição da biodisponibilidade de PLP, e tais pacientes, quando no período neonatal, desenvolvem quadro clínico que inclui epilepsia grave. A análise bioquímica do LCR revela aumento de treonina e de glicina, além de evidências de prejuízo da atividade da AADC. Além disso, a concentração de PLP no LCR está diminuída. O tratamento, que pode ser particularmente eficaz, é realizado por meio da administração de PLP.

Clinicamente, os agonistas de ACh, junto com os anticolinesterásicos, são utilizados no tratamento do glaucoma, uma doença ocular caracterizada pelo aumento da pressão intraocular, causada pelo aumento do tônus dos músculos de acomodação do olho, e para estimular a função intestinal após procedimento cirúrgico. Por outro lado, quando a acetilcolinesterase é inibida pelos inseticidas organofosfatados ou pelos gases que afetam o sistema nervoso, ocorre uma síndrome tóxica causada pelo excesso de acetilcolina. Pode ocorrer diarreia, aumento da atividade secretora de diversas glândulas e broncoconstrição. Essa síndrome pode ser antagonizada pela atropina, apesar de o tratamento a longo prazo envolver o uso de fármacos, como a pralidoxima, que é capaz de remover o inseticida da enzima.

O gás óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é produzido a partir da arginina pelas óxido nítrico sintases dependentes de tetra-hidrobiopterina nos nervos autônomos e entéricos. O NO possui inúmeras funções fisiológicas, incluindo o relaxamento da musculatura lisa, tanto vascular quanto intestinal, e a possível regulação da produção energética mitocondrial. Além disso, no interior do encéfalo, o NO pode estar envolvido na formação da memória. Entretanto, a formação excessiva de NO tem sido implicada nos processos neurodegenerativos associados à s doenças de Parkinson e de Alzheimer. Enquanto o mecanismo exato pelo qual o excesso do NO causa morte neuronal permanece desconhecido, existem fortes evidências sugerindo que o dano irreversível da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial possa ser um fator importante.

O NO não é armazenado em vesículas, mas é liberado diretamente no espaço extracelular. Consequentemente, o NO não preenche todos os critérios atuais para ser rotulado como um neurotransmissor. O NO por si só se difunde facilmente entre as células e se liga diretamente aos grupamentos heme na enzima guanilil ciclase, estimulando a produção do monofosfato de guanosina cíclica (Cap. 7 e quadro da pág. 76).

Outras moléculas pequenas

Atualmente sabe-se que o ATP e outras purinas derivadas dele têm funções transmissoras. O ATP está presente nas vesículas sinápticas dos nervos simpáticos, junto com a norepinefrina, e é responsável pelos potenciais excitatórios rápidos no músculo liso. Os receptores de adenosina estão disseminados no encéfalo e no tecido vascular. A adenosina tem função amplamente inibitória no SNC, e acredita-se que a inibição de receptores de adenosina no SNC seja o mecanismo subjacente aos efeitos estimulatórios da cafeína.

OS MÚLTIPLOS RECEPTORES PARA AS CATECOLAMINAS E A SEROTONINA

Receptores de dopamina e de serotonina

Foram isolados múltiplos receptores para dopamina e serotonina. Nem todos os receptores clonados têm atividade funcional, porém a possível relevância em termos de desenvolvimento de fármacos é óbvia. Em alguns casos, a manipulação específica de determinados receptores pode ser explorada terapeuticamente.

Existem cinco receptores de dopamina conhecidos, pertencentes a dois principais grupos (do tipo D_1: D_1 e D_5, e do tipo D_2: D_2, D_3 e D_4), que diferem em suas vias de sinalização. Os receptores D_1 aumentam a produção de cAMP, enquanto os receptores D_2 a inibem. Os fármacos antipsicóticos, como as fenotiazinas e o haloperidol, tendem a inibir os receptores do tipo D_2, sugerindo que o excesso da atividade dopaminérgica possa ser importante na gênese dos sintomas da esquizofrenia.

O receptor D_2 é o principal receptor nos nervos que interconectam os gânglios basais. Uma vez que se sabe que a destruição desses nervos causa a doença de Parkinson, não é de surpreender que os fármacos antipsicóticos que inibem os receptores D_2 tendam a possuir efeitos adversos que causam movimentos anormais. Fármacos como a clozapina, que se ligam preferencialmente ao receptor D_4, parecem ser livres desses efeitos adversos, apesar de esse fármaco, em particular, também se ligar a diversos outros receptores.

Mais de uma dúzia de receptores de serotonina (5-HT) foi isolada utilizando-se técnicas de biologia molecular. Eles foram divididos em classes e subclasses com base nas suas propriedades farmacológicas e estruturais. A maior parte deles é metabotrópico, apesar de o receptor 5-HT_3 ser ionotrópico e mediar um sinal rápido no sistema nervoso entérico. O receptor 5-HT_{1A} é encontrado em diversos neurônios pré-sinápticos, nos quais ele atua como um autorreceptor inibindo a liberação de 5-HT.

Em geral, o aumento da concentração encefálica de 5-HT parece aumentar a ansiedade, enquanto sua redução é útil no tratamento dessa condição. O antidepressivo buspirona atua como um agonista de receptores 5-HT_{1A} e, presumivelmente, causa diminuição na produção de 5-HT. Além de seus efeitos no receptor D_4 de dopamina, a clozapina se liga fortemente ao receptor 5-HT_{2A} e é possível que um alto grau de antagonismo do receptor 5-HT_{2A}, aliado a uma baixa atividade de ligação em D_2,

seja desejável para que fármacos utilizados no tratamento da esquizofrenia apresentem o mínimo de efeitos adversos. O ondansentrona, um bloqueador de receptor 5-HT_3, é um antiemético muito utilizado na prevenção de vômitos durante a quimioterapia. A enxaqueca pode ser tratada com sumatriptana, um agonista 5-HT_{1D}.

O papel central da 5HT no controle da função encefálica e o grande número de receptores associados sugerem a possibilidade de se produzir grande número de fármacos para o tratamento de desordens específicas; entretanto, a manipulação farmacológica da função do sistema nervoso ainda está dando seus primeiros passos.



A ANÁLISE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO NA DETECÇÃO DE DISTÚRBIOS DO METABOLISMO DA DOPAMINA E DA SEROTONINA

O líquido cefalorraquidiano (LCR) circula em torno das principais estruturas encefálicas e da medula espinhal (Cap. 41). Durante a circulação, as moléculas que refletem metabolismo celular se difundem no LCR. Estão incluídos entre esses metabólitos os produtos de degradação de dopamina e de serotonina, o ácido homovanílico (HVA) e o ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA). Além disso, os precursores e os metabólitos da tetra-hidrobiopterina (BH_4), além da BH_4 propriamente dita, também são secretados diretamente no LCR. Assim, a determinação dessas moléculas no LCR constitui um importante indicador da integridade do metabolismo de dopamina e de serotonina no interior do sistema nervoso central. Tais análises identificaram inúmeros erros inatos do metabolismo que afetam a disponibilidade de dopamina e/ou de serotonina, por exemplo, distúrbios do metabolismo da BH_4, metabolismo do fosfato de piridoxal, deficiência da tirosina hidroxilase e da aminoácido aromático descarboxilase (dopa descarboxilase). A quantificação dos metabólitos mencionados é normalmente realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para essas moléculas, existe um gradiente de concentração no LCR conhecido como gradiente rostrocaudal. Assim, as frações de LCR coletadas mais próximas do encéfalo têm concentrações mais altas desses metabólitos. Além disso, para muitos desses metabólitos, sua concentração diminui com a idade. Consequentemente, diante desses fatores, os laboratórios especializados em diagnósticos solicitam que a mesma fração coletada de LCR seja fornecida para a análise. Além disso, as faixas de referência apropriadas à idade devem estar disponíveis para a correta interpretação dos resultados.

O estudo da histamina em nervos é complicado em função da grande quantidade que está presente nos mastócitos. A histamina é encontrada em pequeno número de neurônios, principalmente no hipotálamo, apesar de suas projeções serem disseminadas por todo o encéfalo. Foi demonstrado que a histamina controla a liberação dos hormônios da pituitária, o alerta e a ingestão de alimentos. Os anti-histamínicos utilizados para controlar as alergias causadas pela liberação de histamina pelos mastócitos atuam em receptores do tipo H_1 e tendem a ser sedativos, sugerindo que outras funções centrais provavelmente também existam. O receptor de histamina no estômago é da classe H_2; assim, os inibidores dos receptores do tipo H_2, como a cimetidina e a ranitidina, que são utilizados no tratamento da úlcera péptica, não exercem efeitos no tratamento da alergia.

SÍNDROME CARCINOIDE: CRISES DE RUBORIZAÇÃO CAUSADAS POR UM TUMOR

Um homem de 60 anos de idade queixa-se de ruborização associada ao aumento da frequência cardíaca. Ele também apresenta diarreia e dor abdominal, além de relatar perda de peso. Os sintomas sugeriram o diagnóstico de síndrome carcinoide causada pelo excesso de secreção de serotonina ou de outros compostos metabolicamente ativos por um tumor. Para confirmar esse quadro, foi coletada uma amostra de urina para a determinação de ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), o principal metabólito de 5-HT. A concentração encontrada foi de 120 mmol/24 h (23 mg/24 h) (faixa de referência 10-52 mmol/24 h, 3-14 mg/24 h).

Comentário. O paciente apresentava uma síndrome carcinoide, que é causada por tumores de células enterocromafins, geralmente originárias do íleo e que se metastatizaram para o fígado. Essas células estão relacionadas à s células cromafins produtoras de catecolaminas na medula adrenal e convertem o triptofano em serotonina (5-HT). Acredita-se que a serotonina propriamente dita cause diarreia, porém outros mediadores, como a histamina e a bradicinina, podem ser mais importantes nas crises de ruborização. A concentração urinária de 5-HIAA fornece um teste diagnóstico útil e pode ser utilizado para monitorar a resposta ao tratamento do câncer.

A TETRA-HIDROBIOPTERINA É UM COFATOR ESSENCIAL PARA A SÍNTESE DE DOPAMINA E DE SEROTONINA

A tetra-hidrobiopterina (BH_4) é um membro do grupo de agentes químicos conhecidos como pterinas. Em geral, a BH_4 é sintetizada por meio de inúmeras etapas enzimáticas, a partir do precursor trifosfato de guanosina (GTP). Em relação ao sistema nervoso central, um suprimento adequado de BH_4 é essencial para as atividades da tirosina e da triptofano hidroxilase. Quando atua como cofator, a BH_4 é oxidada a di-hidrobiopterina quinonoide (qBH_2). A BH_4, sob condições normais, é regenerada a partir da qBH_2 pela enzima di-hidrobiopterina redutase (DHPR). Diversos erros inatos do metabolismo da BH_4 são atualmente conhecidos. Eles podem surgir como resultado de uma falha da síntese *de novo* da BH_4 ou da reciclagem da DHPR. Se não tratados, esses pacientes desenvolvem diversos problemas neurológicos graves que incluem retardo mental, epilepsia e distúrbios do movimento semelhantes aos observados na doença de Parkinson. Após o diagnóstico, os pacientes são tratados com L-dopa e 5-hidroxitriptofano, para transpor o bloqueio metabólico criado pela deficiência de BH_4. Após o início do tratamento, normalmente ocorre melhora clínica, que resulta da correção do metabolismo de dopamina e de serotonina. Entretanto, a BH_4 também é o cofator para todas as isoformas da óxido nítrico sintase. Atualmente existem evidências que sugerem que os pacientes com deficiências de BH_4 também têm um prejuízo na capacidade de gerar NO. Assim, existem pesquisas em andamento a fim de desenvolver formas de corrigir esse prejuízo na via de sinalização do NO, por exemplo, por terapia gênica, tendo como alvo a enzima deficiente do metabolismo da BH_4. Essa abordagem possui a vantagem de corrigir o defeito primário, *isto* é, a deficiência de BH_4.

MIASTENIA GRAVE: UMA DOENÇA QUE CAUSA FRAQUEZA MUSCULAR

Uma mulher de 35 anos de idade observou dificuldade em manter os olhos abertos. Ela também apresentava períodos de visão dupla quando sua voz se apresentava alterada e anasalada, além de dificuldade de deglutição. Seu médico suspeitou de miastenia, uma doença de condução nervo-músculo. O título sérico de anticorpos contra receptores de acetilcolina apresentava-se elevado.

Comentário. A paciente era portadora de miastenia grave. Essa é uma doença que se manifesta como fraqueza dos músculos voluntários e é corrigida pelo tratamento com inibidores da acetilcolinesterase. Essa doença é causada pela produção de autoanticorpos direcionados contra o receptor nicotínico de acetilcolina, os quais são circulantes no soro. Por causa desses autoanticorpos, a transmissão dos impulsos nervosos para o músculo está muito menos eficiente do que o normal.

Os fármacos que inibem a acetilcolinesterase aumentam a concentração de acetilcolina na fenda sináptica, o que compensa o reduzido número de receptores. A melhora na condução nervo-músculo em resposta ao edrofônio pode ser utilizada como um teste diagnóstico, porém necessita de diversas precauções, e o uso de inibidores da acetilcolinesterase de longa duração, como a piridostigmina, pode ser feito no tratamento da doença, porém os corticosteroides são com frequência eficazes.

Peptídios

Muitos peptídios atuam como neurotransmissores

Ainda é uma questão em aberto se todos os peptídios descritos são neurotransmissores verdadeiros. Contudo, foi atualmente demonstrado que mais de 50 pequenos peptídios influenciam a função neural. Todos os receptores de peptídios conhecidos são metabotrópicos e acoplados à proteína G (Cap. 40) e, portanto, são de ação relativamente lenta. Não há vias de captação ou enzimas de degradação específicos, e a principal via de eliminação é a difusão simples seguida de clivagem por inúmeras peptidases no líquido extracelular. Isso permite que um peptídio afete inúmeros neurônios antes que ele seja finalmente degradado.

O peptídio intestinal vasoativo (VIP) é um dos muitos peptídios que afetam a função do intestino por meio do sistema nervoso entérico. Esse peptídio foi originalmente descrito como um hormônio intestinal que afetava o fluxo sanguíneo e a secreção de líquidos, porém atualmente se sabe que trata-se de um neuropeptídio entérico importante, que inibe a contração da musculatura lisa. Ele também causa vasodilatação em diversas glândulas secretoras, além de potencializar a estimulação pela ACh.

Diversos neuropeptídios pertencem a famílias multigênicas

Os peptídios opioides (receptores) são um bom exemplo de uma família multigênica. Eles são os ligantes endógenos para os analgésicos opioides, como a morfina e a codeína. O controle da dor é complexo, e os peptídios opioides e seus receptores são encontrados tanto na medula espinhal quanto no encéfalo propriamente dito. Existem, no mínimo, três genes que codificam esses peptídios, e cada um contém as sequências para diversas moléculas ativas:

- **pró-opiomelanocortina** contém a β-endorfina que se liga aos receptores opioides do tipo μ e também o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e os hormônios estimulantes dos melanócitos (MSH), os quais são hormônios da pituitária (Cap. 40)

- **pró-encefalina A** contém as sequências para as Met- e Leu-encefalinas, que se ligam aos receptores do tipo δ e estão envolvidos na regulação da dor localmente no encéfalo e na medula espinhal

- **pró-dinorfina** contém as sequências para a dinorfina e diversos outros peptídios, que se ligam aos receptores da classe κ.

Os opioides também afetam as vias de sinalização do prazer no encéfalo, o que explica os seus efeitos de euforia, e eles também têm efeitos adversos, como depressão respiratória, o que restringe o seu uso. Em excesso, causam a contração dos músculos dos olhos, resultando em "pupilas de alfinete". Foi demonstrado que endorfinas são secretadas após exercício extenuante, causando o tão conhecido *jogger's high*. Espera-se que mais informações sobre os receptores e as vias neurais dos opioides permitam o desenvolvimento de analgésico com menos efeitos adversos e menor probabilidade de abuso.

A substância P é outro exemplo de membro da família multigênica, conhecida como família da taquicinina. Está presente nas fibras aferentes dos nervos sensoriais e transmite sinais em resposta à dor. Está envolvida na chamada inflamação neurogênica estimulada por impulsos nervosos, e é um importante neurotransmissor no intestino.

Os neuropeptídios podem atuar como neuromoduladores

Alguns peptídios atuam como verdadeiros neurotransmissores, porém eles têm muitos outros tipos de ações. Frequentemente, alteram a ação de outros transmissores, atuando como neuromoduladores, porém não possuindo nenhuma ação por si só. Por exemplo, o VIP aumenta o efeito da ACh na secreção da glândula salivar das glândulas submandibulares de gatos (glândulas localizadas sob o osso maxilar) por causar vasodilatação e potencialização do componente colinérgico. O NPY inibe a secreção de norepinefrina nos terminais nervosos autônomos, que atuam nos autorreceptores pré-sinápticos e potencializam a ação da norepinefrina em determinadas artérias, enquanto suas próprias ações são fracas. Os peptídios opioides também são capazes de modular a secreção de neurotransmissor.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. O óxido nítrico preenche todos os critérios para ser definido como um neurotransmissor verdadeiro?

2. Explique como um neurotransmissor, como a serotonina, pode apresentar efeitos tão diversos no sistema nervoso central.

3. Explique como os neurotransmissores podem ser excitatórios ou inibitórios.

4. Quais são os tipos de neurotransmissores que podem estar reduzidos no encéfalo de um paciente com erro inato afetando a tirosina hidroxilase, o aminoácido aromático descarboxilase e o metabolismo da tetra-hidrobiopterina?

5- Discuta os fatores que precisam ser considerados ao se estabelecer um método diagnóstico para distúrbios do metabolismo de dopamina e de serotonina.

6- Explique o conceito de receptores ionotrópicos e metabotrópicos.

Resumo

Os neurônios se comunicam nas sinapses por meio de neurotransmissores. Grande número de compostos de baixo peso molecular, como as aminas biogênicas ou peptídios maiores, podem atuar como neurotransmissores. Eles atuam em receptores específicos e, normalmente, existe mais de um receptor para cada neurotransmissor. A presença de diversos transmissores nos mesmos nervos e a identificação de múltiplos receptores sugerem a existência de alto grau de flexibilidade e de complexidade nos sinais que podem ser produzidos no sistema nervoso.

Leituras sugeridas

Clayton PT. B6 responsive disorders: a model of vitamin dependency. *J Inherit Metab Dis*. 2006;29:317-326.

Hyland K. Inherited disorders affecting dopamine and serotonin: critical neurotransmitters derived from aromatic amino acids. *J Nutr*. 2007;137(6 suppl 1):1568S-1572S.

Lam AAJ, Hyland K, Heales SJR. Tetrahydrobiopterin availability, nitric oxide metabolism and glutathione status in the hph-1 mouse: implications for the pathogenesis and treatment of tetrahydrobiopterin deficiency states. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30:256-262.

Sites

www.aadcresearch.org www.aadcresearch.org

www.bh4.org www.bh4.org

www.pndassoc.org www.pndassoc.org

Homeostasia Celular: Crescimento Celular, Diferenciação e Câncer

M.M. Harnett, H.S. Goodridge

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Definir os estágios do ciclo celular de mamíferos.
- Descrever como os fatores de crescimento regulam a proliferação celular.
- Descrever a regulação da progressão do ciclo celular pelas ciclinas e quinases dependentes de ciclinas.
- Discutir a regulação da apoptose pelos membros das famílias das caspases e Bcl-2.
- Explicar como a desregulação do controle de crescimento leva ao desenvolvimento de tumores.
- Distinguir entre oncogenes e genes supressores de tumor e descrever as funções que eles desempenham no desenvolvimento do tumor.

INTRODUÇÃO

Em organismos unicelulares, tais como bactérias, a seleção natural favorece as células mais eficientes no crescimento e na divisão e, geralmente, a proliferação é limitada simplesmente pela disponibilidade de nutrientes. Ao contrário, em organismos multicelulares, tais como seres humanos, existem controles elaborados sobre a proliferação de tipos celulares individuais para se manter a integridade global do organismo, tanto em termos de número de tipos de células individuais como também com respeito a sua organização espacial. De fato, em adultos, a despeito de um suprimento abundante de nutrientes, a grande maioria das células não está se dividindo: além disso, a desregulação do controle do crescimento leva ao desenvolvimento de tumores e câncer. Entretanto, sob certas condições, tais como reparo tecidual e senescência, crescimento e proliferação regulados são promovidos. Portanto, quando as células morrem, por senescência ou como resultado de dano tecidual, elas têm de ser substituídas de uma maneira rigorosamente regulada.

A homeostasia celular mantém a integridade dos órgãos através de sobrevivência celular, proliferação e morte celular (por apoptose) controladas para garantir que as células normais, ao contrário das células cancerosas (transformadas), geralmente parem de se dividir quando entram em contato com as células vizinhas.

Muito do que sabemos acerca do controle de crescimento e divisão celular normais surgiu de pesquisas sobre o câncer: a análise das alterações genéticas nas células cancerosas revelou mutações em grande número de genes envolvidos no controle da proliferação celular normal. Esses genes podem ser classificados como proliferativos ou antiproliferativos.

Os genes proliferativos mutados são chamados oncogenes (**genes causadores de câncer**), e seus equivalentes celulares normais são denominados **proto-oncogenes.** Os proto-oncogenes são predominantemente transdutores de sinal que agem regulando o crescimento e a divisão celular normal; a regulação anormal desses processos leva à transformação celular.

Por outro lado, os genes antiproliferativos ou **genes supressores de tumor** normalmente agem suprimindo a proliferação celular. Portanto, mutações que inativam ou levam à perda de expressão de genes supressores de tumor também levam à proliferação descontrolada. Assim, enquanto o fenótipo mutante dos genes supressores de tumor é usualmente recessivo e geralmente requer perda ou inativação de ambos os alelos para sua expressão, uma mutação em apenas um alelo de um proto-oncogene é necessária para produzir transformação celular (fenótipo mutante dominante).

O CICLO CELULAR

As células se reproduzem por duplicação de seu conteúdo e sua divisão em duas; este é um processo complexo e cuidadosamente regulado, denominado ciclo celular

Nos últimos anos, inúmeros pontos importantes de controle do ciclo celular foram elucidados. Em mamíferos, a duração do ciclo celular varia muito de um tipo celular para outro, indo de minutos a anos. Entretanto, células de mamíferos imortalizadas em cultura, que são estudadas em sistemas experimentais, são tipicamente células em divisão relativamente rápida, com um tempo do ciclo de divisão celular de aproximadamente 24 horas.

Tradicionalmente, o ciclo celular é dividido em várias fases (Fig. 43.1). A mitose (fase M) é o estágio de divisão celular; na maioria das células ela dura somente cerca de uma hora. O restante do ciclo celular, durante o qual ocorrem crescimento celular e síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), é conhecido como interfase. A replicação do DNA ocorre durante a fase de síntese (S) da interfase. O intervalo entre as fases M e S é chamado de fase G1, e o intervalo entre as fases S e M é denominado G2. As fases G1 e G2 fornecem tempo não apenas para o crescimento celular, mas também para prover pontos de checagem nos quais o progresso do ciclo celular pode ser controlado e a incorporação de DNA danificado pode ser prevenida antes da divisão celular. Como mencionado anteriormente, os tempos individuais do ciclo celular variam enormemente e é durante a fase G1 que a maior parte dessa variação ocorre. Isso porque as células na fase G1, que não estão comprometidas com a replicação de DNA, podem entrar em um estado especializado de repouso, chamado de fase G0, até que elas recebam sinais apropriados que as permitam progredir mais adiante através do ciclo celular. Nos mamíferos, o tempo necessário para uma célula progredir do início da fase S até a mitose é tipicamente de 12-24 horas, independentemente da duração da fase G1. Portanto, quase todas as variações nas taxas de proliferação entre os tipos celulares são atribuídas à quantidade de tempo despendido nesse estado G0/G1. Além disso, em condições que favorecem o crescimento celular, o ácido ribonucleico total (RNA) e o conteúdo de proteína da célula aumentam continuamente, exceto na fase M, quando os cromossomos estão muito condensados para permitir a transcrição.

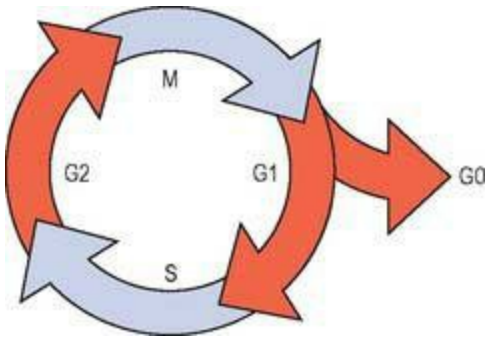


Fig. 43.1 As fases do ciclo celular. A fase de mitose (M) é o estágio da divisão celular e dura cerca de uma hora na maioria das células. As fases G1, S e G2 compreendem a interfase restante, durante a qual ocorrem crescimento celular e síntese de DNA. O ponto de restrição, um ponto ao final da fase G1, é importante na mitogênese (ver no texto mais adiante). S, a fase de síntese da interfase, durante a qual ocorre a replicação do DNA nuclear; G1, o intervalo entre as fases M e S; G2, o intervalo entre as fases S e M (compare com a Figura 31.5).

FATORES DE CRESCIMENTO

Regulação da proliferação celular

As células de um organismo multicelular têm de receber sinais positivos específicos para crescerem e se dividirem. Muitos desses sinais estão sob a forma de hormônios polipeptídicos (por exemplo, insulina), fatores de crescimento (por exemplo, fator de crescimento derivado de plaquetas, PDGF) ou citocinas (p. ex., interleucinas, designadas IL-1 a IL-35). Esses fatores de crescimento se ligam a receptores de superfície celular específicos e iniciam cascatas de sinalização intracelular que finalmente agem para se opor aos controles negativos nas células em repouso que impedem o crescimento e bloqueiam a progressão do ciclo celular. A proliferação da maioria dos tipos celulares geralmente necessita de sinalização via uma combinação específica de fatores de crescimento, em vez de estímulo por um único fator; assim, um número relativamente pequeno de fatores de crescimento pode regular seletivamente a proliferação de muitos tipos celulares. Além do mais, embora a maioria dos fatores que estimulam o crescimento celular também estimule a proliferação celular, alguns induzirão o crescimento celular mas não adivisão. Isso reflete a realidade de que, dentro de um organismo, os tipos celulares individuais variam enormemente em tamanho. Na verdade, algumas células, tais como os neurônios (na fase G0), crescem muito sem nunca se dividir. Além disso, embora as células em proliferação parem de crescer quando são privadas dos fatores de crescimento, elas continuam a progredir através do ciclo celular até que alcancem o ponto na fase G1 no qual podem entrar na fase G0, ou estado de repouso.

Os fatores de crescimento se ligam a receptores de superfície celular específicos, que geralmente são proteínas transmembrana com domínios citoplasmáticos de proteína tirosina quinase (Cap. 40). Atualmente existem cerca de 50 fatores de crescimento conhecidos; o PDGF foi um dos primeiros a ser identificado. As respostas de crescimento e proliferação ao PDGF provaram ser protótipos de muitos outros fatores de crescimento e incluem:

- **aumento imediato de $Ca2^+$ intracelular**, indicativo de início da sinalização transmembrana (Cap. 40)

- **reorganização das fibras de estresse de actina**, que é necessária para a dependência de ancoragem da adesão celular, essencial para a progressão do ciclo celular

- **ativação, translocação nuclear, ou ambas, dos fatores de transcrição** (Cap. 34) que se ligam a regiões reguladoras do DNA dos genes que são responsivos ao fator de crescimento em particular. Esses fatores de transcrição regulam a transcrição de genes de respostas precoces, que frequentemente codificam fatores de transcrição adicionais necessários para a indução de componentes da maquinaria do ciclo celular, tais como as proteínas ciclinas

- **síntese de DNA e divisão celular**

Os fatores de crescimento ativam combinações distintas de transdutores de sinal (Cap. 40) e fatores de transcrição para ditar o repertório preciso de genes que é induzido, permitindo, desse modo, o início de diferentes classes características de respostas.

A ligação dos fatores de crescimento geralmente induz a oligomerização do receptor e a

ativação da tirosina quinase intrínseca ao receptor, causando fosforilação do receptor em sítios específicos de seus domínios citoplasmáticos (transfosforilação; Fig. 43.2). Essa fosforilação de resíduos de tirosina do receptor cria "sítios de ancoragem" que permitem interações proteína-proteína, levando ao recrutamento e à ativação de enzimas de sinalização ou "moléculas adaptadoras", que são transdutoras de sinal e servem como moduladores enzimáticos para as enzimas de sinalização. A transfosforilação dos domínios citoplasmáticos do receptor permite, portanto, o recrutamento e a ativação de um arcabouço de elementos de transdução de sinal (Fig. 43.2), tais como fosfolipase C-γ (PLC-γ), proteína ativadora de GTPase (GAP), proteínas tirosina quinases (PTKs), tais como *Src, Fyn* e*Abl*, fosfotirosina fosfatases (PTPases) e moléculas adaptadoras, tais como *Shc* ou *Grb2*, que discutiremos em mais detalhes mais adiante.

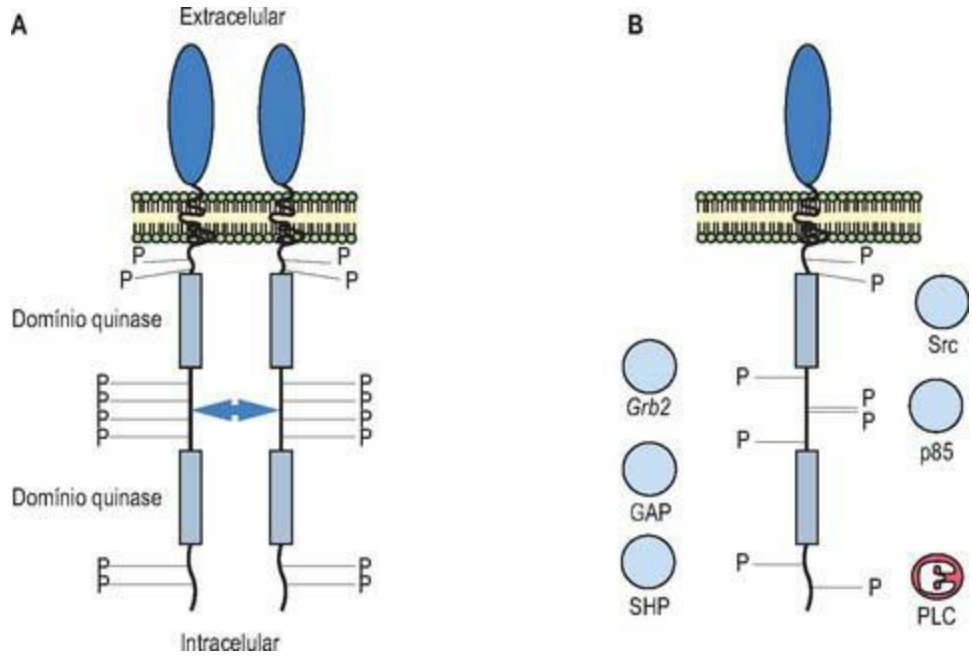


Fig. 43.2 Recrutamento dos elementos de sinalização posteriores (*dowmstream*) para o receptor PDGF ativado. A ligação do fator de crescimento ao receptor induz dimerização e ativação da tirosina quinase intrínseca aos domínios citoplasmáticos do receptor, levando à fosforilação da tirosina (transfosforilação, P) do receptor dimerizado em locais específicos dos domínios citoplasmáticos (A). Os sítios de ancoragem então criados (B) permitem interações proteína-proteína que levam ao recrutamento e à ativação de enzimas de sinalização posteriores, por exemplo, a fosfolipase C (PLC), a proteína ativadora de GTPase (GAP), proteínas tirosina quinases (PTKs), como *Src*, fosfotirosina fosfatases, como SHP (fosfatase contendo o domínio SH2), e moléculas adaptadoras, como Grb2 (que recruta Ras).

PAPEL DAS PROTEÍNAS TIROSINA QUINASES NA TRANSDUÇÃO DE SINAL

Interações dependentes da proteína tirosina quinase (PTK) na sinalização celular

As PTK são enzimas que transferem o grupo γ-fosfato do ATP para resíduos de tirosina das proteínas-alvo. A expressão "proteína tirosina quinase" é um termo genérico para uma grande superfamília de enzimas que compreende tanto os receptores transmembrana com atividade tirosina quinase intrínseca em seus domínios citoplasmáticos quanto uma grande variedade de subfamílias de tirosina quinase citoplasmáticas, tais como as famílias *Src*, *Abl*, *Syk*, *Tec* ou Janus quinase (JAK). A fosforilação de tirosina, que é uma modificação covalente das proteínas, fornece um mecanismo rápido e reversível (pela ação das proteínas tirosina fosfatases) de modificação da atividade enzimática das proteínas-alvo. Além disso, ela pode modificar sua capacidade de agir como moléculas adaptadoras para recrutar outras moléculas sinalizadoras para as redes de proteínas envolvidas na sinalização celular transmembrana. Por exemplo, a fosforilação de resíduos de tirosina dos receptores ou moléculas de sinalização cria "sítios de ancoragem" que permitem interações proteína-proteína, levando ao recrutamento de transdutores de sinal posteriores. Os transdutores de sinal são recrutados para essas tirosinas fosforiladas por meio de domínios de interação proteína-proteína, tais como os chamados domínios SH2, contidos dentro da sequência de muitos transdutores de sinal. SH2 representa a região 2 de homologia *Src* da tirosina quinase *Src* citoplasmática, um elemento de transdução de sinal no qual esse domínio proteico foi primeiramente caracterizado. Os domínios SH2 compreendem aproximadamente 100 aminoácidos e reconhecem especificamente uma fosfotirosina mais os três aminoácidos seguintes na direção C-terminal.

IMPORTÂNCIA DAS PROTEÍNAS TIROSINA QUINASES

A importância das PTKs na proliferação celular e nas funções efetoras é ilustrada pelos defeitos resultantes de mutações nesses genes que ocorrem em humanos. Por exemplo, mutações que levam a uma perda de atividade ou expressão de ZAP-70, uma PTK que tem um papel-chave na ativação de células T dependente de antígeno, podem causar imunodeficiência combinada severa (SCID) devido a graves anormalidades no desenvolvimento de células T. Da mesma maneira, a agamaglobulinemia ligada ao X, uma imunodeficiência caracterizada por falta de produção de anticorpo IgG, é devida a mutações associadas à perda de função em Btk, uma PTK importante para a ativação de célula B. Por outro lado, uma translocação cromossômica, conhecida como cromossomo Filadélfia, que envolve a fusão do gene da região de quebra (BCR – *breakpoint cluster region*) no cromossomo 22 (região q11) com parte do gene Abl no cromossomo 9 (região q34), resulta em uma forma constitutivamente ativa da PTK Abl, que está associada à leucemia mieloide crônica (CML). A presença dessa

translocação é muito importante para o diagnóstico de CML, uma vez que 95% das pessoas com CML têm essa anormalidade. Entretanto, ela não serve como diagnóstico definitivo, já que BCR-Abl também é encontrada em alguns casos de leucemia linfoblástica aguda (ALL) e, ocasionalmente, na leucemia mieloide aguda (AML).

O PDGF sinaliza através das cascatas de fosfatidilinositol e Ras-MAPK

A ligação do receptor de PDGF (PDGF-R) leva ao recrutamento e à ativação da fosfolipase C-γ (PLC-γ), que catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) para gerar os segundos mensageiros intracelulares inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG) (Cap. 40). O IP_3 estimula a liberação de Ca^{2+} dos compartimentos intracelulares e o DAG ativa uma importante família de transdução de sinal, a proteína quinase C (PKC). A ligação do PDGF-R também leva ao recrutamento de uma outra enzima de sinalização lipídica, a fosfoinositídeo-3-quinase (PI-3-quinase). Essa enzima fosforila o PIP_2, produzindo o segundo mensageiro lipídico fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3), que também pode ativar certos membros da família PKC. Além disso, o PIP_3 pode ativar uma outra quinase, chamada quinase dependente de PIP_3 (Cap. 40).

Trinta por cento de todos os tumores têm mutantes constitutivamente ativos de um elemento de sinalização chamado *Ras*, que age como uma chave molecular de uma via de transdução de sinal importante no controle do crescimento e diferenciação. A *Ras* é uma GTPase, que se alterna entre uma forma inativa, *Ras*-GDP, e uma forma ativa, *Ras*-GTP (Fig. 43.3). A troca GTP/GDP é promovida por um fator de troca de nucleotídeos guanina, chamado *Sos*, e a proteína ativadora de GTPase (GAP) inativa a *Ras* por estimular sua atividade de GTPase intrínseca (como faz a GTPase intrínseca da subunidade α das proteínas G heterotriméricas; Cap. 40). A *Ras* é constitutivamente endereçada à membrana plasmática por uma modificação pós-transducional envolvendo a adição de um grupo farnesil lipofílico (Cap. 17) e, então, é recrutada para o PDGF-R ativado pela interação com uma proteína adaptadora chamada *Grb2*.

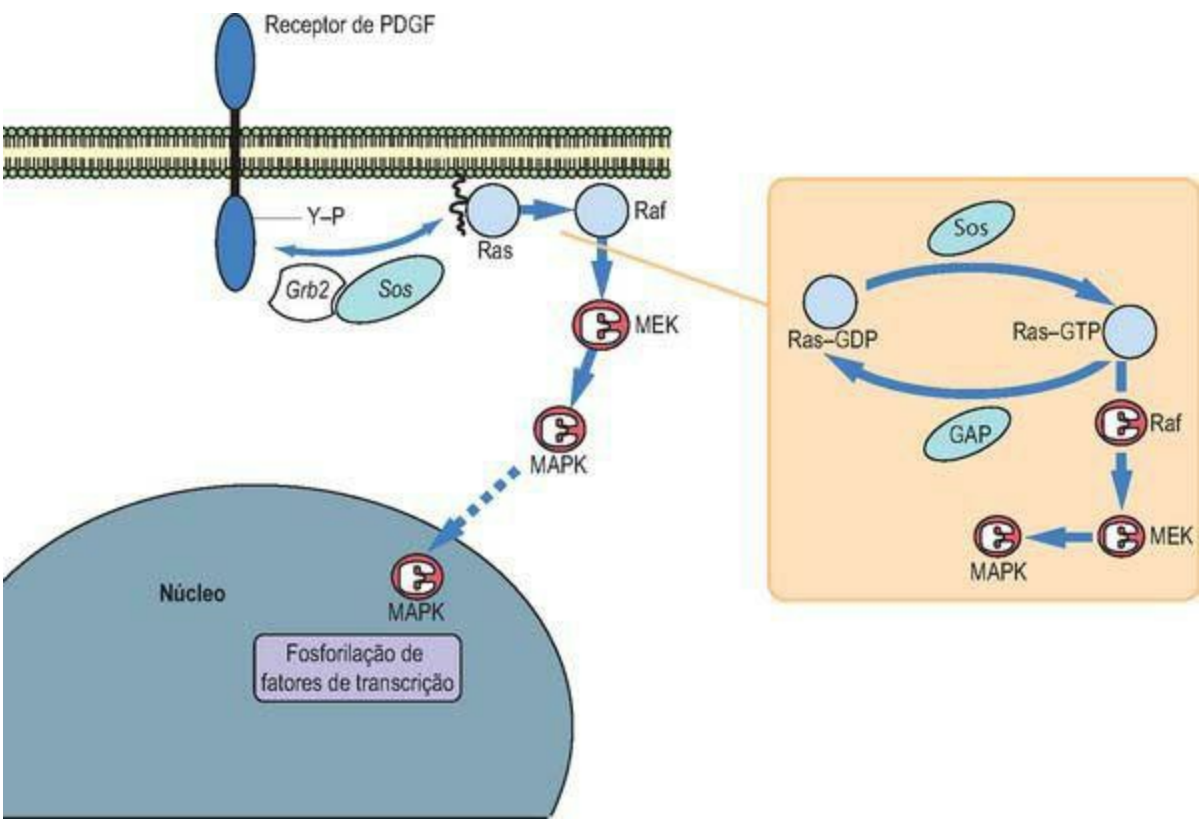


Fig. 43.3 Recrutamento e ativação de Ras pelo receptor de PDGF. A Ras está ancorada na membrana plasmática e é

recrutada para o PDGF-R ativado via interação com o complexo Grb2-Sos. A troca GTP/GDP estimulada pelo receptor e, portanto, a ativação da Ras, é promovida pelo Sos, enquanto a GAP inativa Ras por estimular sua atividade de GTPase intrínseca. A Ras se acopla ao PDGF-R para a ativação da MAPK via estímulo das quinases intermediárias, Raf e MEK quinase. A MAPK se transloca para o núcleo e fosforila (na serina e na treonina) fatores de transcrição importantes envolvidos na regulação da síntese de DNA e na divisão celular. GAP, proteína ativadora de GTP; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno.

Uma das principais funções efetoras da *Ras* é regular a cascata da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). A MAPK é uma serina-treonina quinase, sendo ela própria ativada por fosforilação por uma MAPK quinase com dupla especificidade (tirosina/treonina) chamada MEK. MAPK tem duas isoformas principais, as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) 1 e 2, as quais se translocam para o núcleo e fosforilam (na serina e na treonina) fatores de transcrição-chave envolvidos na regulação da síntese de DNA e da divisão celular.

Sinalização do receptor de citocina

As citocinas são fatores de crescimento que agem especificamente para organizar o desenvolvimento de células hematopoéticas e a resposta imune

Elas também podem ter múltiplos efeitos nos tipos celulares não hematopoéticos (Cap. 38). Tal como os fatores de crescimento, elas medeiam seus efeitos via receptores de superfície celular específicos; embora existam várias classes principais de receptores, muitos receptores de citocinas pertencem à superfamília chamada receptores hematopoéticos. Estes são receptores glicoproteicos transmembrana caracterizados por seus domínios extracelulares conservados, que contêm pares característicos de cisteína e um motivo pentapeptídeo WSXWS (triptofano-serina-aminoácido-qualquer-triptofano-serina). Os receptores não têm atividade catalítica intrínseca e muitos são receptores com multissubunidades, embora nem todas as cadeias pertençam necessariamente a essa superfamília de receptores. Esses receptores com multissubunidades geralmente são caracterizados por uma subunidade única de ligação ao ligante, que confere especificidade, e uma subunidade comum transdutora de sinal, que frequentemente é compartilhada por várias citocinas relacionadas e é a base da subdivisão dos receptores em várias subfamílias distintas. O compartilhamento das subunidades transdutoras de sinal comuns serve para explicar as imunodeficiências severas que resultam de defeitos que surgem naturalmente nesses receptores.

Como citado anteriormente, os receptores hematopoéticos não expressam atividade catalítica intrínseca; entretanto, após a ligação, esses receptores estimulam a atividade de tirosina quinase, e a maioria das citocinas, tal como os fatores de crescimento clássicos, pode sinalizar através das vias da PLC, PI-3-K e *Ras*-MAPK. No entanto, uma família de proteínas tirosina quinases (PTKs) citosólicas tem um papel essencial na sinalização do receptor hematopoético; essas quinases, chamadas Janus quinases (JAKs), se acoplam aos receptores hematopoéticos com uma nova via de transdução que fornece uma ligação direta entre a ativação do receptor e a transcrição gênica (Fig. 43.4). Assim como as *Src* quinases, as JAKs são tirosina quinases citosólicas. Elas se associam aos receptores hematopoéticos em regiões conservadas próximas ao domínio transmembrana e são ativadas e fosforiladas após a ligação da citocina e a oligomerização dos receptores hematopoéticos.

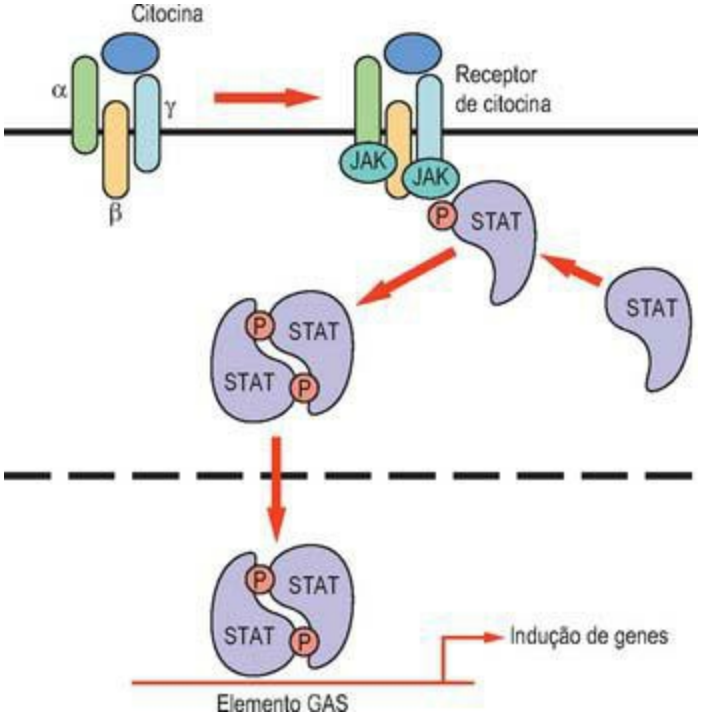


Fig. 43.4 Sinalização do receptor de citocina através das vias JAK-STAT. Após a ligação pelas citocinas, os receptores se oligomerizam. As JAKs são recrutadas e fosforilam resíduos de tirosina nos domínios citoplasmáticos das cadeias do receptor, possibilitando o recrutamento e a fosforilação de STAT. As proteínas pSTAT são liberadas do receptor e formam dímeros que podem se translocar rapidamente para o núcleo e atuar como fatores de transcrição, ligando-se aos elementos GAS. Diferentes combinações de JAKs e STATs podem ser utilizadas por receptores distintos para alcançar especificidade. GAS, sequência de ativação γ JAK, Janus quinase; STAT, transdutor de sinal e ativador de transcrição.

O principal avanço na identificação das funções dessas quinases foi obtido quando os alvos posteriores das JAKs foram identificados como fatores de transcrição, chamados transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs). Os STATs são encontrados sob uma forma monomérica latente no citoplasma de células não estimuladas. A estimulação por citocina leva a fosforilação mediada por JAK e dimerização dos STATs. Os STATs se translocam para o núcleo, onde se ligam a sequências específicas de DNA nos promotores dos genes-alvo e, assim, modulam diretamente a indução dos genes (Fig. 43.4). Recentemente, também foi demonstrado que fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o PDGF, ativam as vias JAK/STAT; assim, essa nova cascata de sinalização pode fornecer um mecanismo universal pelo qual os fatores de crescimento medeiam a indução gênica e as respostas celulares.

REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR

O estímulo pelos fatores de crescimento resulta na indução de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, tais como as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e as ciclinas.

As ciclinas foram originalmente definidas como proteínas que eram especificamente degradadas a cada mitose

As CDKs são quinases que têm de se ligar a uma ciclina para que sejam ativadas. Essa ativação de CDKs dependente de ciclinas regula etapas-chave na progressão do ciclo celular (Fig. 43.5).

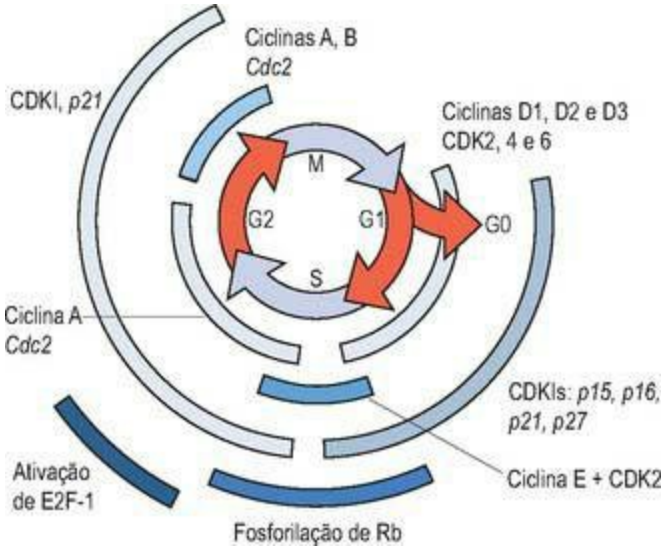


Fig. 43.5 Regulação do ciclo celular. A estimulação dos fatores de crescimento leva à ativação dependente de ciclina da regulação de etapas importantes do ciclo celular por CDKs e seus inibidores. As ciclinas e seus respectivos CDKs parceiros, agindo em diferentes estágios da progressão do ciclo celular, são mostrados. CDK, quinase dependente de ciclina; CDKI, inibidor de CDK; E2F-1, um fator de transcrição; *Rb*, proteína do retinoblastoma.

A atividade das ciclinas é modulada por mudanças em seus níveis de expressão, tanto no nível de mRNA quanto de proteína (controles de transcrição e tradução). Ao contrário, as CDKs são expressas em quantidades relativamente constantes e suas atividades são moduladas por seus estados de fosforilação. Além disso, um nível adicional de controle foi revelado pela identificação recente de inibidores de CDK (CDKIs) que se ligam às CDKs e agem como subunidades inibidoras para bloquear suas atividades catalíticas.

Mitogênese

Os fatores de crescimento mitogênicos exercem seus efeitos entre o início da fase G1 e um ponto tardio desta fase, denominado ponto de restrição

Uma vez que a célula tenha passado pelo ponto de restrição, as fases restantes do ciclo celular até a fase M praticamente não são afetadas pelos sinais extracelulares e estão comprometidas em progredir em vez de entrar em quiescência. A proteína do retinoblastoma, *Rb*, controla a expressão dos genes que comprometem as células que estão no ponto de restrição tardio da fase G1 a entrar na

fase S (fase de síntese de DNA) do ciclo celular. Portanto, no início da fase G1, a *Rb* hiperfosforilada reprime o avanço do ciclo celular por se ligar e impedir a atividade de ligação ao DNA de uma família de fatores de transcrição, chamados *E2F*, que têm funções importantes na transição das fases G1/S. Em contrapartida, próximo ao ponto de restrição, o estímulo pelo fator de crescimento induz os complexos ciclina D-CDK4 e 6 e, então, o complexo ciclina E-CDK2, a hiperfosforilarem a *Rb*. A resultante liberação da inibição de *E2F* permite a ativação de genes, cujos produtos são importantes para a entrada na fase S (Fig. 43.5).



X-SCID: DEFICIÊNCIA DA CADEIA γ COMUM DE INTERLEUCINAS

A imunodeficiência combinada grave ligada ao X (X-SCID) é uma desordem que causa uma imunodeficiência muito grave. Ela é caracterizada por imunidades celular e humoral profundamente defeituosas, o que resulta em suscetibilidade muito aumentada à infecção, e é uniformemente fatal para pacientes com 1-2 anos de idade, a não ser que sejam submetidos a transplante de medula óssea. Os homens com X-SCID tipicamente têm imunidades celular e humoral profundamente defeituosas, com baixo número de células T ou até mesmo nenhuma delas, mas quantidade normal de células B.

Comentário. Foi primeiramente relatado que o gene responsável pela X-SCID codificava a cadeia γ do receptor de IL-2. Agora está claro que essa cadeia γ é compartilhada com os receptores de IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 e IL-15, explicando, assim, a imunodeficiência grave na X-SCID, já que o paciente é incapaz de responder a várias ou a todas essas citocinas (Cap. 38). O domínio intracelular dessa proteína se associa com a PTK JAK3, levando à indução de genes, e ao crescimento e à proliferação celulares. De acordo com isso, mutações em JAK3 constituem causa de uma forma autossômica recessiva de SCID. Anteriormente, o transplante de medula óssea compatível era a única terapia eficaz, mas agora é possível reparar o defeito na cadeia γ com terapia gênica mediada por vírus das células precursoras B e T derivadas da medula óssea do próprio paciente, uma vez que as células "reparadas" podem proliferar em resposta a citocinas e substituir as células defeituosas. A descoberta de que mutações em JAK3 também resultavam em SCID sugeriu que JAK3 pode ser um bom alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos imunossupressores, e realmente os inibidores de JAK3 já estão sob estudos pré-clínicos e clínicos como potenciais terapias, não somente para a rejeição de órgão transplantado, mas também para doenças autoimunes, tais como psoríase, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal e artrite reumatoide. Além disso, tais inibidores provavelmente exibem potencial terapêutico em cânceres nos quais a atividade anormal de JAK3 foi demonstrada, tal como leucemia mieloide aguda (AML) e cânceres colorretal e de pulmão.

Monitoramento de danos do DNA

A proteína supressora de tumor *p53* é uma proteína predominantemente sensível a danos do DNA, e através dela a célula monitora esses danos ao longo do ciclo celular. Ela pode parar a progressão do ciclo celular para permitir o reparo do DNA por indução do *p21* CDKI (WAF1), que impede a fosforilação dependente de CDK e a inativação de Rb. Como WAF1 pode afetar uma variedade de complexos ciclina-CDK, parece que a parada de crescimento pode ocorrer em qualquer ponto do ciclo celular. Entretanto, embora um dano reparável mínimo induza a parada de crescimento mediada

por *p53*, para permitir o reparo do DNA e evitar o acúmulo de mutações ao prevenir a replicação do DNA danificado na fase S, um dano grave, irreparável, desencadeia a morte celular programada dependente de *p53* por apoptose.

CASCATAS DE SINALIZAÇÃO DA MAPK

A cascata da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) foi originalmente elucidada por estudos genéticos em leveduras, mas a via provou ser altamente conservada evolutivamente de leveduras a mamíferos, permitindo que os elementos de mamíferos fossem identificados por clonagem homóloga. Nos últimos anos, descobriu-se que as MAPKs são componentes-chave de uma rede interativa de cascatas sequenciais de proteínas quinases (cassetes MAPK), que servem para ligar os primeiros sinais transduzidos pelos receptores aos eventos transcricionais relacionados com crescimento e diferenciação no núcleo. "MAPK" é o nome genérico de uma superfamília de quinases transdutoras de sinal que, até o momento, abrangem três subfamílias principais de cassetes MAPK denominadas quinases reguladas por sinal extracelular (ERK; p. ex., *p44*ERK1 e *p42*ERK2), proteínas quinases ativadas por estresse (SAPK) ou *Jun N*-terminal quinases (JNK) e quinases reativadoras *p38* (*p38*RK). Esses cassetes MAPK podem fosforilar os fatores de transcrição envolvidos na indução gênica inicial imediata, tal como AP-1 (*Jun* e *Fos*), ELK-1 e SAP1. Além disso, enquanto a ativação de SAPKs e *p38*RKs pode induzir seletivamente a apoptose sob certas condições, ERK1 e ERK2 geralmente atuam promovendo sobrevivência e proliferação celular.

Fatores de crescimento e progressão do ciclo celular

A ligação entre a sinalização do receptor do fator de crescimento e a progressão do ciclo celular pode ser vista pela análise de dois exemplos importantes. Primeiro, o fator de transformação de crescimento β (TGF-β), um fator de crescimento que regula negativamente o crescimento em muitos tipos celulares, medeia muitos de seus efeitos através da inibição dos complexos ciclina D-CDK4 e 6, que promovem a progressão do ciclo celular. De fato, em alguns tumores, a transformação parece resultar de deleção ou inativação funcional de receptores de TGF-β ou elementos de transdução de sinal posteriores (*downstream*) associados. Segundo, o elemento sinalizador central, *Ras*, que se apresenta mutado para uma forma constitutivamente ativa em aproximadamente 30% dos tumores, de forma similar parece exercer muitos dos seus efeitos, se não todos, regulando positivamente as concentrações de ciclina D e, portanto, estimulando a progressão do ciclo celular. Essa regulação positiva da expressão de ciclina D resulta da estimulação da cascata de MAPK por *Ras* e da indução do fator de transcrição AP-1, que regula a indução da expressão da ciclina D (Fig. 43.6).

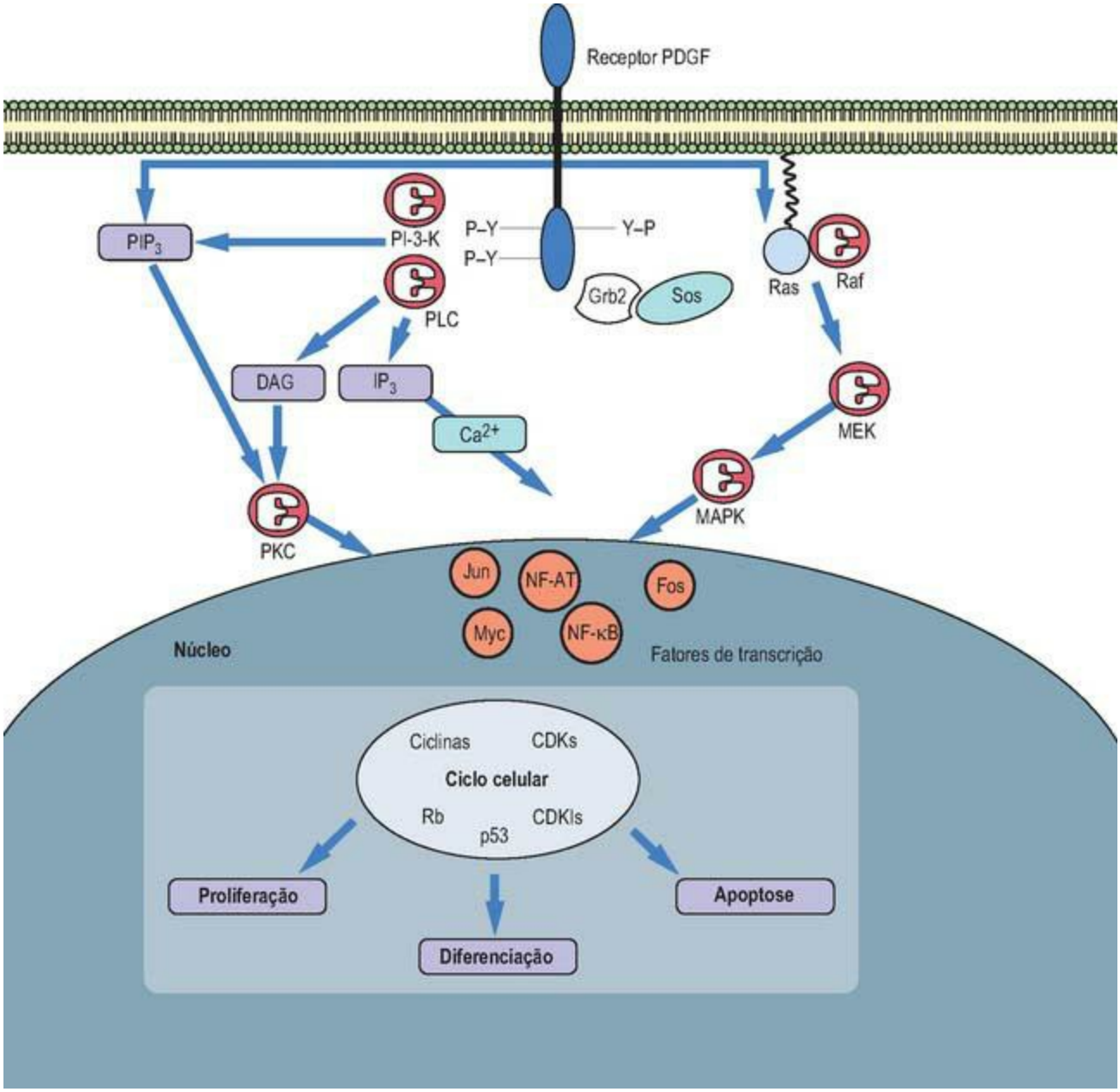


Fig. 43.6 Regulação do ciclo celular pelo fator de crescimento. Os sinais dos fatores de crescimento gerados na membrana plasmática podem transduzir indução de genes, progressão do ciclo celular e proliferação, diferenciação ou apoptose. A sinalização do receptor do fator de crescimento leva à ativação de fatores de crescimento, tais como *Jun* e *Fos* (que dimerizam para formar AP-1), *Myc*, NF-AT e NF-κB. Estes regulam a indução de componentes da maquinaria do ciclo celular que monitoram e direcionam a progressão do ciclo celular, parada do crescimento celular e diferenciação celular. A indução do dano ao DNA, que resultaria no acúmulo de mutações, leva à parada do ciclo celular e reparo do DNA. Alternativamente, se o dano ao DNA é muito grande, ocorre a morte da célula por apoptose. DAG, diacilglicerol; IP_3, inositol-1,4,5-trifosfato; PI-3K, fosfoinositídeo-3-quinase; PIP_3, inositol-3,4,5-trifosfato; PKC, proteína quinase C; PLC, fosfolipidase C.

ATAXIA TELANGIECTASIA

A ataxia telangiectasia é uma doença autossômica recessiva rara causada por mutações no gene mutado ataxia telangiectasia (*ATM*). Os sinais e sintomas incluem andar cambaleante, telangiectasia, pigmentação da pele, infertilidade, deficiências imunológicas e incidência aumentada de câncer, especialmente de tumores linforreticulares.

Comentário. A ATM pertence a uma família de proteína quinase que regula a indução de respostas a danos no DNA em reação à radiação ionizante, tratamento anticâncer ou quebras

programadas do DNA durante a meiose. Pacientes com ataxia telangiectasia apresentam grande aumento da suscetibilidade ao câncer e sensibilidade aumentada à radiação ionizante. Na ataxia telangiectasia, as células apresentam instabilidade cromossômica, hipersensibilidade aos reagentes que induzem quebras nas fitas de DNA, defeitos nas fases G1/G2 e regulação alterada da expressão de *p53* e *p21* WAF1. A proteína *ATM* é constitutivamente expressa durante o ciclo celular e tem sido atribuída a uma função de ponto de checagem no monitoramento de danos do DNA e na determinação de que parada de crescimento e reparo do DNA mediados por *p53* ou apoptose dependente de *p53* ocorrem em resposta a danos graves do DNA. Na ataxia telangiectasia, as células com *ATM* mutado falham em ativar adequadamente a *p53*, e, portanto, em induzir a parada de crescimento ou a apoptose em resposta à radiação ionizante. Além disso, quando a *p53* também está mutada, o ciclo celular é desregulado e o risco de formação de tumor é aumentado como resultado do acúmulo de mutações.

APOPTOSE

A apoptose, uma forma de morte celular programada, ocorre durante o desenvolvimento celular normal

Esse é um processo biológico fundamentalmente importante, necessário para a manutenção da integridade e da homeostasia de organismos multicelulares. Apoptose inapropriada pode levar a condições degenerativas, tais como doenças neurodegenerativas, e a desorganização e interrupção da maquinaria da apoptose podem resultar em câncer (Tabela 43.1) ou doença autoimune. As células que morrem por dano tipicamente dilatam e se rompem (necrose), mas a apoptose é caracterizada por mudanças morfológicas drásticas da célula, incluindo redução do tamanho, condensação de cromatina, clivagem e desorganização em vesículas envoltas por membrana, chamadas corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados pelas células vizinhas. O acúmulo de esteróis na membrana plasmática e a translocação da fosfatidilserina para o folheto externo da membrana plasmática servem para sinalizar a célula apoptótica para eliminação via fagocitose pelas células vizinhas ou pelos macrófagos.

Tabela 43.1 Relações entre vários tipos de câncer e os estágios do ciclo celular. É provável que algum nível de interrupção da maquinaria do ciclo celular ocorra em todo tipo de célula cancerosa. Como a maioria das decisões proliferativas é feita no ponto de restrição ao final da fase G1, o alvo-chave da transformação celular parece ser a proteína do retino-blastoma, *Rb*. De fato, agora está claro que os eventos de transdução de sinal que levam à fosforilação e à inativação funcional de *Rb* são perdidos em muitas células cancerosas, sugerindo que a inativação de *Rb* possa ser crucial para desregular a proliferação de células malignas.

Câncer e o ciclo celular		
Câncer	**Elemento do ciclo celular**	**Resultado: *status* da proteina do retinoblastoma (Rb)**
	expressão aumentada de ciclina como resultado da amplificação gênica ou translocação cromossômica	hiperfosforilação e inativação da proteina do retinoblastoma (Rb) levando à proliferação desregulada de células malignas
câncer de mama, leucemia carcinomas testiculares tumores de mama	ciclina D1 ciclina D2 ciclina E	
retinoblastomas, carcinomas de pulmão de pequenas células, osteossarcomas	inativação mutacional dos genes Rb	perda do controle do ciclo celular por Rb, levando à proliferação desregulada de células malignas
carcinomas cervicais	sequestra de Rb pela proteína E7 do papilomavírus humano	perda do controle do ciclo celular por Rb
variedade de células tumorais	deleção dos genes CDK*I*, p 14, *p15*	perda da inibição dos complexos ciclina D-CDK4/6, resultando em hiperfosforilação inapropriada e inativação de Rb
melanomas	CDK4 mutante, demonstrando resistência aos produtos dos genes CDKI, *p14, p15*	perda da inibição dos complexos ciclina D-CDK4/6, resultando em perda do controle do ciclo celular por Rb

Pesquisas recentes elucidaram muitos dos sinais bioquímicos que regulam a apoptose e identificaram duas famílias importantes de proteínas que parecem ser centrais para a regulação da morte celular por apoptose em mamíferos. Estas são as famílias de cisteína proteases, chamadas caspases, e os membros da família relacionada com a proteína do linfoma de células B 2 (*Bcl-2*), que servem para modular a sobrevivência da célula pela regulação da atividade da caspase.

Caspases

As caspases estão envolvidas na apoptose

As caspases agem pela clivagem de proteínas-alvo importantes, resultando na desorganização sistemática da célula apoptótica por:

- interromper a progressão do ciclo celular
- desativar os mecanismos homeostáticos e de reparo
- iniciar a separação da célula das estruturas teciduais circundantes
- desorganizar os componentes estruturais, tais como o citoesqueleto
- sinalizar as células que se encontram no processo de morte programada para a fagocitose

A superexpressão de caspases ativas é suficiente para causar a apoptose celular

As caspases são expressas como pró-caspases inativas, e é provável que a ativação dessas moléculas ocorra sob a forma de cascata, com a ativação inicial de uma caspase reguladora servindo para ativar, por proteólise, as caspases efetoras posteriores. Os receptores de morte celular, tais como o do fator de necrose tumoral (TNF)-R e o do *Fas* (também conhecido como CD95 ou APO-1), medeiam as vias de morte celular por apoptose em inúmeros tipos celulares, mas particularmente em células do sistema imune. Eles iniciam a apoptose recrutando diretamente as pró-caspases, tais como a caspase 8, para suas moléculas transdutoras com "domínio de morte" acessórias, induzindo, desse modo, a cascata de ativação proteolítica da caspase (Fig. 43.7). Essas moléculas com domínio de morte incluem a proteína de domínio de morte associada a *Fas* (FADD), a proteína de domínio de morte associada a TNF-R (TRADD), a proteína de interação com receptor (RIP) e as proteases do tipo ICE associadas à RIP (RAIDD). Os mecanismos moleculares precisos da ativação da caspase efetora são ainda desconhecidos. Entretanto, foi descoberto recentemente que a proteólise e a ativação das caspases efetoras são facilitadas pela ligação do citocromo *c*, que é liberado da mitocôndria durante o processo de apoptose.

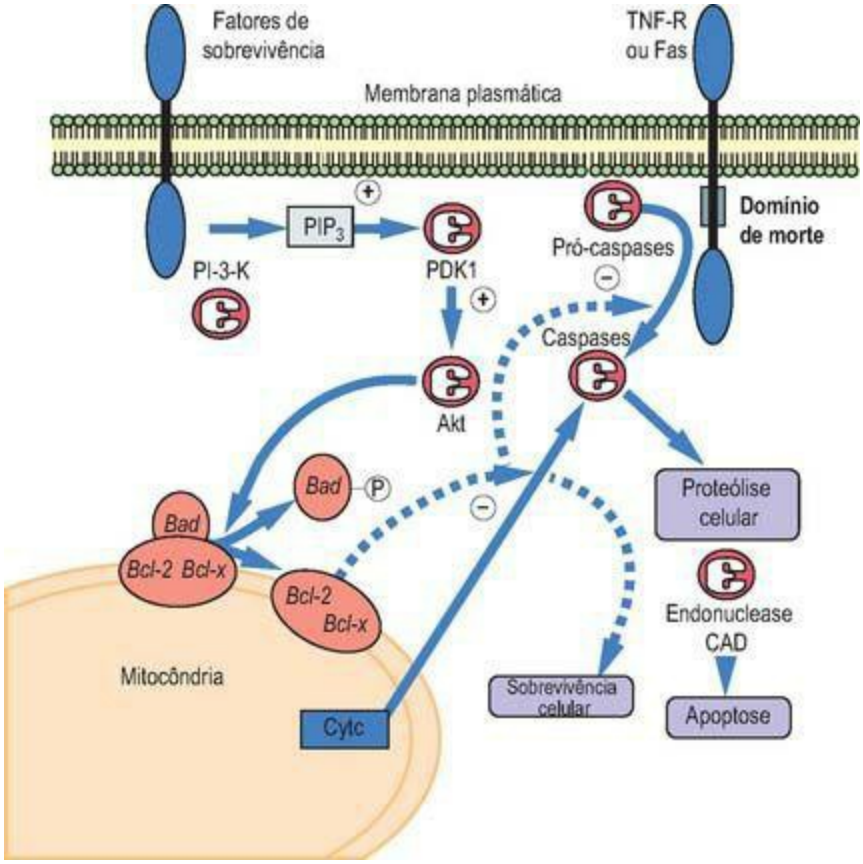


Fig. 43.7 Regulação da apoptose e resgate celular mediado por fator de crescimento. Os receptores de morte celular, como o receptor de TNF (TNF-R) ou *Fas*, recrutam as pró-caspases, como a caspase 8, para suas moléculas transdutoras com "domínio de morte" (FADD, TRADD, RIP e RAIDD), induzindo, assim, a cascata de ativação proteolítica da caspase de morte celular por apoptose. Por outro lado, a cascata regulada pela família *Bcl-2* pode ser modulada por fatores de sobrevivência acoplados à fosfoinositídeo-3-quinase (PI-3-K), resultando em resgate das células da apoptose e promoção da sobrevivência da célula. A PI-3-K catalisa a produção de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3), que estimula a quinase dependente de PIP_3 (PDK), resultando em fosforilação e ativação da proteína quinase *Akt*. A *AKT*, por sua vez, fosforila o Bad, um membro pró-apoptótico da família *Bcl-2*, induzindo sua dissociação dos complexos heterodiméricos com *Bcl-2* ou *Bcl-*x_L e permitindo que *Bcl-2/Bcl-*x_L antagonize a morte celular ao impedir a liberação do citocromo c (Cyt c) e a ativação da caspase. CAD, endonuclease dependente de caspase.

A família do gene *Bcl-2*

Bcl-2 é uma proteína antiapoptótica essencial

A família do gene *Bcl-2* compreende proteínas estruturalmente relacionadas que formam homo ou heterodímeros e atuam para promover ou para antagonizar a apoptose através da modulação da ativação da caspase.

APOPTOSE DESREGULADA NA FORMAÇÃO DE TUMOR: INTERRUPÇÃO DA MAQUINARIA APOPTÓTICA NAS LEUCEMIAS DE CÉLULAS B

Durante a linfopoese, os progenitores de células B (75%) e T (95%) que falham em rearranjar seus genes de receptor de antígeno de maneira produtiva, não independente, são programados para morrer por apoptose. A descoberta de que o gene de sobrevivência celular, *Bcl-2*, é sujeito à translocação cromossômica nos linfomas foliculares humanos sugeriu que a desorganização das vias apoptóticas possa ter um papel-chave na transformação maligna. Portanto, por desregulação da proteína antiapoptótica central, *Bcl-2*, essa translocação promove a sobrevivência das células que, de outra maneira, morreriam, e que, então, adquirem as mutações adicionais necessárias para a transformação maligna.

Já foi demonstrado que *Bcl-2* pertence a uma família de proteínas que, pela regulação da integridade mitocondrial e liberação do citocromo c, modulam a atividade da caspase e, consequentemente, estão intimamente envolvidas na regulação da seleção das vias alternativas de sobrevivência celular ou apoptose. Assim, enquanto os membros da família, como *Bcl-2* e *Bcl-x* L, inibem a apoptose, suas atividades de sobrevivência celular podem ser antagonizadas pelo *Bcl-x* S (uma variante de baixo peso molecular do *Bcl-x* L, resultante de *splicing* alternativo), Bak, Bax e Bad. As ações antagonistas dessas proteínas podem ser ilustradas por estudos mostrando que, enquanto a perda de Bax promove a formação de tumores em camundongos, a superexpressão de Bax pode suprimir a transformação celular *in vitro*. De forma similar, diversos vírus (p. ex., adenovírus, vírus Epstein-Barr, vírus da febre suína africana, herpesvírus Saimiri e herpesvírus humano 8) aumentam sua replicação codificando homólogos virais de *Bcl-2* para promover a sobrevivência da célula hospedeira. Finalmente, o supressor do tumor *p53* parece ativar a apoptose, pelo menos em parte, pela regulação negativa da expressão de *Bcl-2* e pela regulação positiva de Bax; isso fornece uma razão a mais para o *p53* ser o gene mais comumente mutado em cânceres humanos.

ANÁLISE DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR E DAS CÉLULAS APOPTÓTICAS

O conteúdo de DNA das células varia ao longo do ciclo celular, aumentando durante a fase S de DNA cromossômico diploide, em G0/G1, para tetraploide, em G2/M, antes de retornar a diploide novamente após a fase M. Além disso, o conteúdo de DNA subdiploide é um indicador de apoptose, já que a ativação de endonucleases, resultando em degradação de DNA, é um evento característico da apoptose. Os fragmentos de DNA resultantes, que diferem em tamanho por unidades de 200 pares

de bases, podem ser visualizados por eletroforese em gel de agarose como "*DNA ladders*" ("escadas de DNA"). O ciclo celular ou o estado apoptótico das células podem, portanto, ser facilmente avaliados no laboratório pela medida do conteúdo de DNA. A citometria de fluxo, que mede a fluorescência de células individuais, pode ser combinada com uma variedade de técnicas de coloração fluorescente para avaliar as proporções das células em uma população que está em diferentes estágios do ciclo celular ou em apoptose (Fig. 43.8). Análise similar de células ou tecidos pode ser realizada por citometria de varredura a *laser*, que permite as análises de imagem e quantitativa de imunofluorescências em um formato baseado em lâmina.

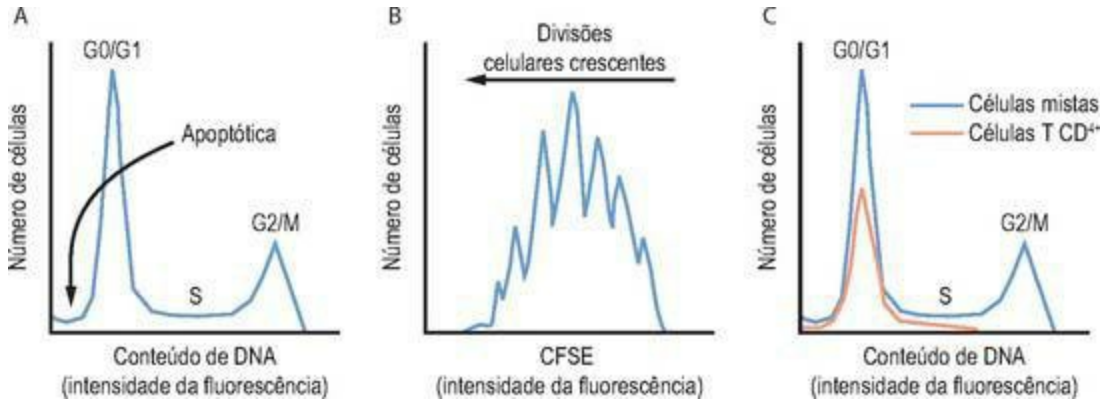


Fig. 43.8 Análise da progressão do ciclo celular e das células apoptóticas. (A) Medida do conteúdo de DNA em células coradas com iodeto de propídeo (PI) ou DAPI, por citometria de fluxo, permite a avaliação do *status* do ciclo celular de cada uma das células em uma população. Tetraploide = G2/M, diploide = G0/G1, intermediário = fase S; o conteúdo de DNA subdiploide indica células em apoptose. (B) Quando células coradas com CFSE se dividem, o CFSE se divide igualmente entre as células filhas, reduzindo a intensidade da fluorescência das células filhas à metade em cada divisão. A citometria de fluxo revela discretas subpopulações celulares representando gerações sucessivas de células. (C) Coloração da superfície das células com um anticorpo fluorescente específico para CD4, marcador de células T *helper*, sugere que as células T $CD4^+$ nessa população mista de células estão paradas em G0. DAPI, 4′,6′-diamino-2-fenilindol.

Por exemplo, a coloração com iodeto de propídio (PI), que se intercala dentro da hélice do DNA, mede o conteúdo total de DNA das células; o 4′-6′-diamidino-fenilindol-2HCl (DAPI) funciona de maneira similar, ligando-se preferencialmente aos pares de bases A-T. A incorporação de bromodesoxiuridina (*BrdU*), um análogo da timidina precursora do DNA, no DNA recém-sintetizado das células em progressão através da fase S, também pode ser detectada por citometria de fluxo usando anticorpos anti-*BrdU* conjugados com corantes fluorescentes.

A apoptose também pode ser medida pelo ensaio de TUNEL, no qual fragmentos de DNA apoptótico, gerados pela ação de endonucleases, podem ser marcados com corantes fluorescentes. Assim, a enzima desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) é usada para adicionar um nucleotídeo marcado com biotina, tal como dUTP, às extremidades dos fragmentos de DNA e, então, essas extremidades marcadas com biotina podem ser visualizadas pela ligação do ligante da biotina, estreptavidina, que foi conjugado com corantes fluorescentes.

O diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster não fluorescente (CFDA SE), que é convertido ao CFSE fluorescente pela ação de esterases citoplasmáticas, é um reagente muito eficaz para se estudar a divisão de células em proliferação. Quando células coradas com CFSE se dividem, o CFSE é uniformemente distribuído entre as células filhas; cada divisão reduz a intensidade da fluorescência do CFSE das células filhas em aproximadamente à metade. A análise por citometria de fluxo revela, portanto, distribuições de frequência discretas das células com níveis de fluorescência

progressivamente reduzidos (picos no histograma), representando gerações sucessivas de células (Fig. 43.8).

A coloração com várias cores usando corantes fluorescentes com diferentes espectros de emissão pode também ser realizada para gerar informação extra sobre as subpopulações de células. Por exemplo, anticorpos contra marcadores celulares específicos conjugados com outros corantes fluorescentes podem ser empregados para estabelecer se um agente leva todas as células, ou um tipo celular individual dentro de uma população mista de células, a progredir ao longo do ciclo celular, parar na fase G0 ou sofrer apoptose.

O *Bcl-2* foi inicialmente descrito como uma translocação cromossômica em um linfoma folicular de células B, o qual contribui para o crescimento neoplásico pela inibição da apoptose de células B normais. Os mecanismos moleculares que fundamentam os sinais de sobrevivência mediados por *Bcl-2* ainda não são muito bem definidos, mas parece que *Bcl-2*, que está localizado na membrana mitocondrial externa, pode agir prevenindo a perda de citocromo *c* da mitocôndria e, portanto, a ativação de caspases efetoras (Fig. 43.7).

CÂNCER

As células que sofrem mutações que comprometem a regulação da divisão celular se dividirão independentemente das necessidades globais do organismo e se assemelharão a um tumor ou neoplasia

Contanto que as células neoplásicas permaneçam como um tumor intacto, diz-se que o tumor é benigno e que pode ser removido cirurgicamente. Entretanto, se mutações adicionais permitem que essas células tumorais invadam e colonizem outros tecidos, criando tumores secundários espalhados ou metástases, o tumor é descrito como maligno e classificado como câncer. Cada câncer é derivado de uma única célula que sofreu mutações hereditárias que permitem que ela cresça mais do que as células vizinhas; no momento em que os tumores são detectados pela primeira vez, eles contêm tipicamente um bilhão de células. Os cânceres são classificados de acordo com o tecido e o tipo celular dos quais são derivados: os de células epiteliais são os carcinomas, os de tecido conjuntivo ou células musculares são denominados sarcomas e os do sistema hematopoético são chamados leucemias. Cerca de 90% dos cânceres humanos são carcinomas, sendo os cinco mais comuns os de pulmão, estômago, mama, cólon/reto e cérvix uterina.

Uma única mutação não é suficiente para converter uma célula saudável em uma célula cancerosa: várias mutações raras têm de ocorrer em conjunto

Mutações no DNA ocorrem espontaneamente a uma taxa de 10^{-6} mutações por gene por divisão celular (até mesmo mais em presença de mutagênicos). Assim, uma vez que aproximadamente 10^{16} divisões celulares ocorrem no corpo humano ao longo de um tempo de vida médio, é provável que cada gene humano sofra mutação em cerca de 10^{10} ocasiões. Claramente, então, uma única mutação não é suficiente para converter uma célula saudável em uma célula cancerosa; várias mutações raras têm de ocorrer ao mesmo tempo, como demonstrado por estudos epidemiológicos mostrando que, para qualquer câncer, a incidência aumenta exponencialmente com a idade. Na verdade, estimou-se que 3-7 mutações independentes são habitualmente necessárias; as leucemias aparentemente precisam de menos, e os carcinomas, de mais mutações.

A progressão do tumor pode ser observada quando desorganizações iniciais mínimas da regulação celular evoluem para um câncer. Por exemplo, a leucemia mielogênica crônica (CML) é inicialmente caracterizada pela superprodução de leucócitos como resultado de translocação cromossômica. Esse estágio crônico da doença permanece estável por vários anos antes de se transformar na fase aguda, de progressão rápida da doença, na qual as células acumularam várias outras mutações que fazem com que elas proliferem mais rapidamente. Por outro lado, as mutações podem ter surgido de tal forma que os progenitores comprometidos das células continuam a se dividir indefinidamente, em vez de por fim se diferenciarem e morrerem após um número estritamente regulado de divisões celulares, como ocorre com seus equivalentes normais.

As mutações que bloqueiam o desenvolvimento normal das células em direção a uma célula diferenciada, que não está em divisão, ou a uma célula que normalmente seria programada para morrer por apoptose, têm mostrado representar uma parte essencial em muitos cânceres

Dessa maneira, drogas que promovem a maturação celular podem se revelar pelo menos tão úteis quanto aquelas direcionadas à prevenção da proliferação celular (drogas citotóxicas). É interessante notar que existem evidências crescentes de que a sinalização anormal, que tem sido

geralmente associada ao desenvolvimento do câncer, pode também estar associada a certos distúrbios do desenvolvimento. Por exemplo, várias mutações que levam à ativação aumentada da via *Ras*-ERK MAPK quinase têm sido associadas a doenças, como a neurofibromatose 1 (defeito na neurofibromina, que é uma *Ras* GAP) e a síndrome de Costello (H-*Ras*), que são caracterizadas por defeitos craniofacial, cardiovascular e hematológico, e crescimento e desenvolvimento comprometidos, incluindo dificuldades de aprendizado, assim como maior propensão ao desenvolvimento de uma variedade de tumores.

MUTAÇÕES GENÉTICAS FUNDAMENTAIS PARA O DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL

A triagem de células de câncer colorretal com sondas específicas de DNA para proto-oncogenes e genes supressores de tumor conhecidos mostrou que 50% desses tumores têm uma mutação pontual de ativação no oncogene *Ras* e 75% desses cânceres têm uma mutação de inativação no *p53*. Além disso, estudos de polipose adenomatosa familiar (FAP, ver a seguir) mostraram que mais de 70% dos cânceres de cólon têm uma mutação no gene da polipose adenomatosa coli (APC). De fato, agora parece claro que mutações que inativam o APC podem representar um estágio inicial no desenvolvimento de uma célula de câncer de cólon porque as mutações no APC podem ser detectadas com a mesma frequência em pólipos benignos pequenos como em tumores malignos grandes. Essas mutações no APC parecem promover a transformação do epitélio normal através de um estágio de epitélio hiperproliferativo até um adenoma precoce. O próximo estágio parece envolver a mutação ativadora de *Ras* (raramente encontrada em pequenos pólipos, mas comum em pólipos grandes), que induz mudanças na diferenciação celular típica da transformação celular (adenoma intermediário) e que permite que as células cresçam em cultura de uma maneira independente de ancoragem. Essas mudanças são seguidas por uma mutação em um gene supressor de tumor chamado "deletado no carcinoma de cólon" (DCC), para gerar um adenoma tardio que é convertido em um adenocarcinoma pela perda subsequente de *p53*. A perda da função de sensibilidade a danos do DNA de *p53* permite que as células acumulem, a uma taxa rápida, as mutações adicionais necessárias à metástase.

Comentário. Embora essas mutações pareçam ser as etapas limitantes de velocidade em grande número de cânceres colorretais, deveria ser observado que outras sequências de mutações também podem gerar essa doença. Na verdade, em cerca de 15% dos casos, os pacientes com uma síndrome hereditária chamada câncer colorretal não poliposo (HNPCC) têm uma mutação no gene HNPCC, que normalmente age reparando pareamentos incorretos nas sequências de nucleotídeo da dupla hélice do DNA. Assim, em tais pacientes, a probabilidade de desenvolvimento de câncer colorretal é aumentada, já que a mutação no HNPCC reduz a fidelidade da replicação do DNA e, consequentemente, aumenta a tendência das células de sofrerem mutação.

Para que a metástase ocorra, as células em um tumor têm de ser capazes de escapar da adesão às células vizinhas, invadir tecidos circundantes, entrar nos sistemas sanguíneo ou linfático e, finalmente, invadir e colonizar um novo tecido. Os mecanismos envolvidos ainda não são muito bem compreendidos, mas parece que, no epitélio, a perda de expressão da molécula de adesão E-caderina tem um papel-chave na capacidade da célula em sair do seu tumor de origem. Além disso, para se ligar e atravessar a lâmina basal, as células têm de expressar integrinas específicas, para se ligar à

laminina, e colagenase tipo IV, para digerir a lâmina.

TESTE DE PAPANICOLAU OU TESTE DO ESFREGAÇO (*"PAP SMEAR" TEST*) DA CÉRVIX UTERINA

O epitélio da cérvix uterina se assemelha à epiderme da pele e compreende uma camada basal proliferativa que gera células que se diferenciam em células achatadas, ricas em queratina, que eventualmente se desprendem da superfície. Os cânceres da cérvix uterina estão fortemente associados à infecção pelo papilomavírus humano dos tipos 16 e 18, e se originam de mutações nas células do epitélio basal, que, então, não estão mais confinadas à camada basal, mas invadem a área normalmente ocupada pelas células diferenciadas e ricas em queratina (displasia). Essas células proliferativas são liberadas em um estágio menos maduro de diferenciação do que o normal. Enquanto as células diferenciadas são caracterizadas por seu tamanho grande e núcleo altamente condensado, as células mutantes têm núcleo relativamente grande e pouco citoplasma, de tal forma que a displasia pode ser identificada no teste do esfregaço (*Pap smear test*), que simplesmente envolve a análise microscópica da morfologia de uma amostra de células raspadas da cérvix. A displasia frequentemente permanece estável ou mesmo regride espontaneamente. Entretanto, ela pode progredir para uma lesão mais grave, chamada carcinoma *in situ*, na qual o epitélio é inteiramente constituído de células proliferativas indiferenciadas, com núcleos de tamanhos e formas variados. Essa lesão pode ser completamente curada por cirurgia; entretanto, em 20-30% dos casos, o carcinoma *in situ* progride por vários anos para um carcinoma cervical maligno.

Comentário. A morfologia nuclear anormal é uma ferramenta diagnóstica importante dos patologistas para a identificação do câncer e se correlaciona com a desestabilização dos cariótipos das células cancerosas quando elas são cultivadas. Esses cariótipos instáveis exibem genes que se tornam amplificados ou deletados e cromossomos que são altamente suscetíveis a perda, duplicação ou translocação. Essas descobertas sugerem que as células desenvolveram uma ou mais mutações nos mecanismos que regulam replicação de cromossomos, reparo, recombinação ou segregação, facilitando, assim, o acúmulo de múltiplas mutações necessárias ao desenvolvimento do câncer.

Oncogenes: transdutores de sinal mutados

Como mencionado anteriormente, mutações que levam à proliferação descontrolada de células cancerosas podem resultar de interrupção do controle da divisão celular normal ou, alternativamente, de uma redução dos processos normais de diferenciação terminal ou apoptose.

Essa distinção é refletida pelos dois grupos principais de genes-alvo de mutações: oncogenes e genes supressores de tumor (Tabela 43.2).

Tabela 43.2 Fatores envolvidos na proliferação descontrolada de células cancerosas.

Oncogenes, fatores de transcrição e genes supressores de tumor (antioncogenes)	
Oncogene	**Papel da sinalização intracelular**
fatores de crescimento	*v-Sis* codifica uma sequência quase idêntica ao PDGF-β ativo

superexpressos	Int-2 e k-Fgf-hst estão relacionados com o fator de crescimento de fibroblasto (FGF)
receptores de fatores de crescimento superexpressos e/ou constitutivamente ativos	v-ErbB é análogo ao domínio citoplasmático ativo do receptor EGF (EGF-R)
	v-Fms está relacionado com o receptor do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF-R)
	v-kit está relacionado com o PDGF-R
	Mas está relacionado com o receptor de angiotensina acoplado à proteína G; a superexpressão de receptores normais também pode levar à transformação
proteínas G	Gs mutado *(gsp)* nos tumores de pituitária/tireoide Gi mutada *(gip2)* nos tumores adrenocorticais/ovarianos
	Ras: mutado em 30% dos tumores humanos
quinases	Src, Abl: proteínas tirosina quinases
	Raf: serina-treonina quinase
oncomodulina	proteína de ligação ao cálcio similar à calmodulina, encontrada somente em células cancerosas
genes de regulação do crescimento	*Jun* e *Fos:* fatores de transcrição
	Myc. um fator de transcrição que regula a proteína tirosina fosfatase Cdc25
	Myb e *Mos:* regulam a transição das fases G1/S
	Cdc2: regulação da transição das fases S/M
	Família *Bcl-2:* sobrevivênda celular
genes supressores do tumor	*p53:* gene mais frequentemente mutado nos cânceres humanos; regulador do ciclo celular e da apoptose
	gene *Rb:* regulador do ciclo celular

gene da neurofibromatose - análogo à proteína ativadora de *Ras* GTPase (GAP)

Os oncogenes foram primeiramente identificados como genes virais que infectam as células normais e as transformam em células tumorais

Por exemplo, o vírus do sarcoma de Rous, um retrovírus que causa tumores em tecido conjuntivo de galinhas, infectará e transformará os fibroblastos crescidos em cultura. As células transformadas crescem mais do que as células normais e exibem várias anormalidades de crescimento, tais como perda da inibição do crescimento mediada pelo contato celular e perda da dependência de ancoragem do crescimento. Além disso, as células têm aparência arredondada e podem proliferar na ausência de fatores de crescimento. Além do mais, as células são imortais, não entram em senescência e podem induzir a formação de tumor quando injetadas em um animal apropriado.

A chave para a compreensão da transformação da célula reside na mutação de um gene celular normal que controla o crescimento celular. O uso do vírus do sarcoma de Rous mutante que, a despeito de se multiplicar normalmente, perdeu a capacidade de transformar as células hospedeiras, demonstrou que o gene *Src* era o responsável por essa transformação celular. O avanço na nossa compreensão de como esse único gene poderia transformar células em cultura aconteceu quando se tornou evidente que o oncogene viral era um homólogo mutado de um gene celular normal. Esse gene é agora denominado proto-oncogene *c-Src* e foi identificado como uma proteína tirosina quinase transdutora de sinal envolvida no controle normal do crescimento celular. Como a expressão desse gene não é essencial para a sobrevivência do retrovírus, é provável que o *Src* tenha sido acidentalmente incorporado pelo vírus a partir de um genoma de hospedeiro anterior e foi de alguma forma mutado durante o processo. No caso do vírus do sarcoma de Rous, os íntrons normalmente presentes no *c-Src* são removidos (*spliced out*) e ainda existem várias mutações causando substituições de aminoácidos, resultando em uma enzima constitutivamente ativa.

A transformação celular pode, entretanto, resultar também de oncogenes que não são constitutivamente ativos, mas em vez disso são superexpressos em um número absurdamente alto de cópias, como consequência de o gene estar sob controle de potentes promotores ou acentuadores no genoma viral. Alternativamente, para os retrovírus, as cópias de DNA do RNA viral inserido no genoma do hospedeiro próximo ou nos locais dos proto-oncogenes (mutação por inserção) podem causar ativação anormal desses proto-oncogenes. Nessa situação, o genoma alterado é herdado por toda a progênie da célula hospedeira original.

A maioria dos tumores humanos não é de origem viral e surge de mutações espontâneas ou induzidas. Aproximadamente 85% dos tumores humanos surgem como resultado de mutações pontuais ou deleções, e não através de envolvimento viral. Essas mutações podem ser espontâneas ou induzidas por carcinógenos ou radiação, resultando em superexpressão ou hiperatividade dos proto-oncogenes. Além disso, a cariotipagem de células tumorais tem demonstrado, por exemplo, que a conversão do proto-oncogene *Abl* (tirosina quinase) em um oncogene na CML resulta de uma translocação cromossômica entre os cromossomos 9 e 22, com pontos de quebra nos genes *Abl* e *Bcr*, respectivamente, levando à geração de um cromossomo chamado cromossomo Filadélfia. Essa translocação resulta na geração de uma proteína de fusão que compreende o *N*-terminal do *Bcr* e o *C*-terminal do *Abl*. O domínio *Abl* quinase dessa proteína de fusão é hiperativo e leva à proliferação

anormal de um clone de progenitores hematopoéticos na medula óssea. Em outros casos, a translocação faz com que o oncogene fique sob o controle de um promotor inapropriado. Por exemplo, no linfoma de Burkitt, a superexpressão do gene *Myc* ocorre através de sua translocação para a vizinhança de um dos *loci* Ig. Como o *Myc* normalmente age como um sinal proliferativo nuclear, sua superexpressão induz a divisão da célula, mesmo sob condições que normalmente determinariam a parada de crescimento.

As ações dos oncogenes são dominantes e a mutação em um único alelo é, portanto, suficiente para transformar células em cultura

Estudos com camundongos transgênicos superexpressando múltiplos oncogenes ilustraram o ponto, mencionado anteriormente, de que os cânceres humanos são usualmente gerados após o acúmulo de mutações por vários anos. Por exemplo, camundongos transgênicos superexpressando os ongocenes *Myc* ou *Ras* exibem tipicamente alguns tecidos absurdamente grandes. Ocasionalmente, com a idade, alguns desses camundongos desenvolvem poucos tumores, de maneira consistente com a expressão de um oncogene herdado, o que aumenta o risco de acúmulo de mutações adicionais e, consequentemente, o início dos cânceres. Entretanto, a grande maioria dessas células transgênicas não desenvolve qualquer câncer. Ao contrário, camundongos duplamente transgênicos, superexpressando os oncogenes *Myc* e *Ras*, desenvolvem cânceres em uma taxa muito maior – um fenômeno conhecido como colaboração do oncogene. Um exemplo de tal ação sinérgica em cânceres humanos é dado pelo linfoma de células B, que conta com a cooperação entre a superexpressão de *Myc* (para direcionar a divisão celular inadequada) e *Bcl-2* (para inibir a apoptose e promover a sobrevivência de células B).

Genes supressores de tumor

Desordem do ciclo celular

As mutações em genes supressores de tumor são recessivas e, portanto, mutações em ambas as cópias do gene são geralmente necessárias para a transformação. Como é muito difícil identificar a perda de função de um único gene em uma célula, muito da informação inicial relacionada com genes supressores de tumor foi obtido com estudos de uma variedade de síndromes de cânceres hereditários (Tabela 43.3).

Tabela 43.3 Síndromes selecionadas de cânceres hereditários. AML, leucemia mieloide aguda; HGF, fator de crescimento de hepatócito; KIP2, nibidor de 57 kDa dos complexos ciclina/CDK.

Síndromes selecionadas de cânceres herdados		
Síndrome	**Câncer**	**Produto gênico**
		Rb 1:

Retinoblastoma familiar	retinoblastoma osteossarcoma	regulação do ciclo celular e da transcrição
Li-Fraumeni	sarcomas, carcinomas adrenocorticais carcinomas de mama, pulmão, laringe e cólon tumores cerebrais leucemia	p53: fator de transcrição dano do DNA e estresse
Polipose adenomatosa famíliar (FAP)	câncer colorretal: adenomas colorretais, tumores duodenal e gástrico, osteomas de maxilar e tumores desmoides (síndrome de Gardner), meduloblastoma (síndrome deTurcot)	APC: regulação de β-catenina, ligação do microtubulo
Síndrome de Wiedmann-Beckwith	Tumor de Wilms, organomegalia, hemi-hipertrofia, hepatoblastoma, câncer adrenocortical	p57/KIP2: regulador do ciclo celular
Neurofibromatose tipo 1 (NF1)	neurofibrossarcoma, AML, tumores cerebrais	proteína ativadora da GTP-ase (GAP) para *p21* Ras
Câncer renal papilar hereditário	câncer renal	Met Receptor HGF
Melanoma familiar	melanoma câncer pancreático nevo displásico	*p16* (CDK): inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK4/6)
		quinase

	sinais de pele atípicos (atypical moles)	dependente de ciclina (CDK4)

O gene do retinoblastoma (Rb)

O retinoblastoma, um tipo raro de câncer humano, é um bom exemplo de síndrome de câncer que tem representado uma fonte importante de informações sobre genes supressores de tumor. Nesse câncer, células progenitoras neurais da retina imatura são transformadas por um número extraordinariamente baixo de mutações. O retinoblastoma ocorre em crianças, com uma incidência de cerca de uma em 20.000. Na forma hereditária da doença, ocorrem múltiplos tumores, afetando ambos os olhos, enquanto na forma não hereditária (muito rara), somente um olho é afetado por um único tumor. Descobriu-se que os que sofrem de ambas as formas da doença apresentam uma deleção de uma banda específica no cromossomo 13; a análise desse defeito genético em pacientes individuais mostrou que os pacientes com a doença hereditária tinham deleção ou mutação com perda de função no gene *Rb* em todas as células. Essa mutação predispôs essas células a se tornarem cancerosas porque uma única mutação somática para eliminar a cópia remanescente do gene *Rb* foi suficiente para iniciar o câncer. De fato, em aproximadamente 70% dos casos, o segundo gene *Rb* e suas regiões flanqueadoras no cromossomo são completamente deletadas ou substituídas pelas regiões correspondentes do cromossomo defeituoso por um processo de recombinação mitótica (perda de heterozigose). Por outro lado, embora os pacientes com a doença não hereditária não apresentem mutações em qualquer cópia de seus genes *Rb* nas células não cancerosas, ambas as cópias são defeituosas em suas células cancerosas. Isso explica a raridade da doença não hereditária, porque mutações somáticas em ambas as cópias de *Rb* em uma única célula da retina são necessárias para a transformação. Dado o papel-chave da proteína do retinoblastoma, *Rb*, na regulação negativa da progressão do ciclo celular (ver anteriormente), talvez não seja surpresa que a perda da função de *Rb* participe de uma parte importante da progressão do tumor. Portanto, embora o retinoblastoma seja uma doença rara, mutações no *Rb* não o são e ocorrem em muitos dos cânceres mais comuns, tais como os de pulmão, mama e carcinomas de bexiga.

POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAR (FAP) E CÂNCER DE CÓLON

A investigação de genes associados a cânceres hereditários tem permitido nossa compreensão a respeito de mutações somáticas em cânceres esporádicos e a função desses elementos de sinalização na regulação normal do crescimento celular. A FAP, uma doença rara que afeta 1 em 7.000 nos Estados Unidos, é caracterizada por mutações inativadoras em linhagens germinativas do gene *APC*. Embora estas mutações germinativas em *APC* sejam raras, mutações somáticas em *APC* estão presentes em mais de 70% dos pólipos adenomatosos e dos carcinomas de cólon e reto. Em células normais, *APC* atua promovendo a degradação da proteína β-catenina, que, através de suas interações com fatores de transcrição, direciona a ativação transcricional. Portanto, em células com APC mutado, a β-catenina se acumula e se liga e ativa fatores de transcrição, resultando em controle de crescimento desregulado e câncer. Evidências adicionais para uma função essencial de sinalização de β-catenina no desenvolvimento de câncer têm sido fornecidas por células cancerosas contendo mutações em β-catenina que a tornam insensível à degradação mediada por APC e à repressão da ativação transcricional.

Comentário. Estudos do uso de aspirina em humanos têm sugerido que inibidores da

ciclooxigenase (COX: enzimas que têm uma função essencial na conversão do mediador inflamatório ácido araquidônico a várias prostaglandinas; Cap. 40) podem alterar a história natural do câncer de cólon. Um estudo duplo cego randomizado mostrou que a aspirina previne a formação de adenomas em pacientes com câncer colorretal prévio. Na verdade, não apenas o risco da doença parece estar reduzido nos usuários regulares de aspirina, mas também o risco de câncer de cólon metastático ou fatal parece estar reduzido em até 50% nos usuários crônicos deste fármaco. Este efeito da aspirina parece resultar da inibição de COX-2, que é expressa em altos níveis na maioria dos tumores de cólon, e reflete as funções importantes que as prostaglandinas têm na patogênese do câncer como resultado da modulação de uma ampla variedade de respostas celulares, tais como mitogênese, adesão celular, vigilância imunológica e apoptose.

A proteína supressora de tumor *p53*

A p53 é um regulador do ciclo celular que tem um papel-chave não apenas na regulação da progressão do ciclo celular da fase G1/S, mas também no monitoramento de danos do DNA

Indivíduos com somente uma cópia funcional do gene *p53* estão predispostos a desenvolver grande variedade de tumores, incluindo sarcomas, carcinomas de pulmão, mama, laringe e cólon, tumores cerebrais e leucemias. Tal como o retinoblastoma, essa síndrome, chamada síndrome de Li-Fraumeni, é rara, e as células tumorais nos paciente afetados têm defeitos em ambas as cópias do *p53*. Novamente como o retinoblastoma, embora a síndrome de Li-Fraumeni seja rara, a incidência de mutações no *p53* em cânceres comuns é extremamente alta. A deleção no *p53*, além de permitir a progressão descontrolada do ciclo celular, também permite a replicação do DNA danificado, levando a mutações carcinogênicas adicionais ou amplificação gênica; talvez não seja surpresa, portanto, que as lesões mais comuns no câncer genético sejam encontradas no *p53*.

Resumo

- A maioria dos proto-oncogenes e dos genes supressores de tumor identificados atuam na transdução de sinal para mimetizar os efeitos da estimulação mitogênica persistente, desacoplando, assim, as células de seus controles externos normais.

- Essas vias de sinalização convergem para a maquinaria que controla a passagem da célula através da fase G1 e impedem a saída do ciclo celular.

- Além disso, outros genes, muitos dos quais são alvo das translocações cromossômicas específicas do câncer, levam a diferenciação linhagem-específica anormal e decisões de desenvolvimento que normalmente induziriam a apoptose. As duas proteínas supressoras de tumor, p53 e Rb, que têm funções importantes ao determinarem a progressão do ciclo celular e a apoptose, e os genes que codificam essas proteínas, são mais frequentemente comprometidos nas células cancerosas.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Como é a progressão através do ciclo celular regulado?

2. Que funções os membros das famílias das caspases e do *Bcl-2* desempenham na regulação da apoptose?

3. Como as mutações nos genes *Rb* ou *p53* contribuem para a progressão do tumor?

Leituras sugeridas

Bensaad K, Vousden KH. p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol*. 2007;17:286-291.

Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:297-308.

Meier P, Vousden KH. Lucifer's labyrinth – ten years of path finding in cell death. *Mol Cell*. 2007;28:746-754.

Rozengurt E. Mitogenic signalling pathways induced by G-protein coupled receptors. *J Cell Physiol*. 2007;213:589-602.

Youle R, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:47-59.

Sites

Biblioteca virtual sobre Biblioteca virtual sobre biologia celular (Virtual Library of Cell Biology) (ciclo celular, apoptose etc.). www.vlib.org/Science/Cell_Biology.

Páginas sobre Páginas sobre biologia de Kimball. www.biology-pages.info.

Enciclopédia de ciências Enciclopédia de ciências da vida da natureza (Nature's Encyclopedia of Life Sciences). www.els.net.

Centro de informações Centro de informações sobre genética do câncer (Genetics of Cancer Resource Center). www.intouchlive.com/cancergenetics.

Envelhecimento

J.W. Baynes

OBJETIVOS

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a correlação entre envelhecimento e doença.
- Explicar o gráfico de Gompertz e como ele descreve a taxa de envelhecimento nas diferentes espécies.
- Diferenciar entre as teorias biológicas e químicas do envelhecimento.
- Explicar os preceitos da teoria do envelhecimento pelos radicais livres, incluindo a identificação dos produtos característicos de oxidação que se acumulam, com a idade, em proteínas de vida longa.
- Delinear as evidências de que a taxa de mutação do DNA é um determinante importante na velocidade do envelhecimento.
- Delinear as evidências que sustentam a teoria mitocondrial do envelhecimento e descrever como essa teoria faz a interface com a teoria do envelhecimento pelos radicais livres.
- Descrever a etiologia e a patologia característica de diversas doenças do envelhecimento acelerado.
- Descrever os efeitos da restrição calórica na taxa de envelhecimento em roedores.

INTRODUÇÃO

O envelhecimento pode ser definido como uma deterioração, dependente do tempo, das funções de um organismo. Embora os efeitos do envelhecimento sejam amplamente baseados na fisiologia, ele é fundamentalmente o resultado de alterações na função, na estrutura, na bioquímica e no metabolismo celular (Tabela 44.1). O resultado do envelhecimento, mesmo no envelhecimento saudável, é o aumento da suscetibilidade à doença e o aumento da probabilidade de morte – o ponto final do envelhecimento. Entretanto, o envelhecimento não é uma doença. O envelhecimento afeta a todos nós, seja de forma programada ou estocástica, e as doenças afetam uma fração da população.

Tabela 44.1 Mudanças nos sistemas bioquímico e fisiológico durante o envelhecimento.

Alterações bioquímicas e fisiológicas durante o envelhecimento	
Bioqulmica	**Fisiológica**
Taxa metabólica basal	Volume de expansão pulmonar
Taxa de renovação (*turnover*) de proteínas	Capaddade de filtração renal (glomerular)
Tolerânda à glicose	Capacidade de concentração renal (tubular)
Capaddade reprodutiva	Desempenho cardiovascular
Encurtamento de telômero	Sistema musculoesquelético
	Velocidade de condução nervosa

Fosforilação oxidativa	Sistemas endócrino e exócrino Defesas imunológicas Sistemas sensoriais (visão, audição)

Com o envelhecimento da população, a gerontologia e a medicina geriátrica estão se tornando cada vez mais importantes. Este capítulo apresenta uma visão geral das alterações bioquímicas e fisiológicas associadas ao envelhecimento, seja de forma geral ou devido ao envelhecimento de sistemas de órgãos específicos. Ele inclui uma revisão das teorias atuais do envelhecimento (existem diversas teorias e, normalmente, quanto mais teorias existem, menos nós realmente entendemos a respeito de algum assunto) e conclui com uma discussão da correlação entre câncer e envelhecimento, além de uma atualização das abordagens a respeito do aumento da expectativa de vida.

Envelhecimento de sistemas complexos

Excluindo-se os defeitos genéticos, as doenças da infância e os acidentes, os seres humanos sobrevivem até aproximadamente os 50 anos de idade com necessidades limitadas de manutenção ou risco de morte. A partir de então, tornamo-nos cada vez mais frágeis, e nossa taxa de mortalidade aumenta com o tempo, alcançando o máximo em torno dos 76 anos. Nossa expectativa de vida é afetada pela nossa genética e exposição ambiental, e nossa morte é normalmente atribuída à falência de um sistema de órgãos críticos (cardiovascular, renal, pulmonar etc.). Normalmente, a capacidade desses sistemas fisiológicos interdependentes declina, como uma função linear da idade, o que leva a aumento exponencial da nossa taxa de morte específica por idade (Fig. 44.1). Historicamente, a melhora nos cuidados da saúde e do ambiente levaram a uma "retangularização" da curva de sobrevida – nossa expectativa de vida média aumentou, porém sem um efeito significativo na expectativa de vida máxima (Fig. 44.1A).

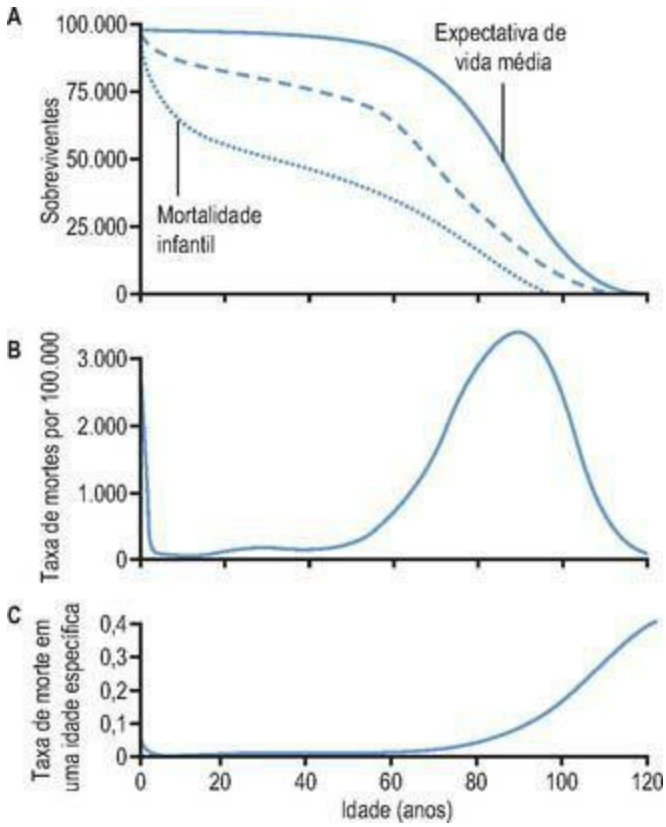


Fig. 44.1 Curva de sobrevivência e taxa de morte. (A) A expectativa de vida média é definida como a idade na qual 50% da população sobrevive (ou morre). A inclinação negativa da curva de sobrevivência atinge um máximo na expectativa de vida média de uma espécie. A linha tracejada descreve uma curva de sobrevivência para o Terceiro Mundo, onde a mortalidade infantil e as doenças diminuem de forma significativa a expectativa de vida média. A linha pontilhada descreve uma curva de sobrevivência para os Estados Unidos no início do século XX. A linha sólida refere-se à Europa no século XXI. (B) A taxa de morte alcança o máximo na expectativa de vida média. (C) A taxa de morte específica para a idade, definida como o número de mortes em uma determinada idade por tempo (por exemplo, mortes por 100.000 pessoas de uma idade específica por ano) aumenta exponencialmente com a idade. A expectativa de vida ou a expectativa de vida potencialmente máxima (MLSP) é definida como a idade máxima que pode ser atingida por um membro da população, que é em torno de 120 anos para os seres humanos.

O limite de Hayflick – a senescência replicativa

As células diferenciadas de animais passam por somente um número limitado de divisões celulares (duplicação da população) em cultura de tecidos, a não ser que elas sejam transformadas em células cancerígenas, seja por meio de mutação ou pela infecção com determinados vírus. O número potencial das divisões celulares é maior em animais de vida longa, sugerindo uma correlação entre potencial de divisão celular e longevidade. Os fibroblastos neonatais humanos irão se dividir em torno de 60 vezes, e depois entram em um estado de não divisão, enquanto os fibroblastos de camundongos e de ratos, que têm expectativa de vida mais curta, passam por menos divisões celulares *in vitro*. As células de doadores mais jovens têm maior capacidade de replicação e maior número de divisões celulares em cultura de células, porém o número de células que se dividem diminui com a idade. Essa limitação da capacidade de duplicação, descrita por Dr. Leonard Hayflick, é conhecida como limite de Hayflick. A relevância do limite de Hayflick para o envelhecimento humano ainda está em debate – certamente as células humanas mantêm alguma capacidade de replicação, mesmo em idades avançadas, e os principais tecidos, como os músculos e os nervos, são basicamente pós-mitóticos, isto é, não se dividem ativamente. Entretanto, as alterações no metabolismo de células senescentes, incluindo a resposta diminuída aos hormônios e o declínio de suas capacidades de síntese e de degradação, por exemplo nos sistemas imunológico e reticuloendotelial, podem afetar nosso poder de adaptação e a suscetibilidade ao estresse e às doenças relacionadas com a idade, colocando limites na nossa expectativa de vida.

Modelos matemáticos do envelhecimento

No início do século XIX, Gompertz observou que a taxa de mortalidade específica por idade em humanos aumentava exponencialmente após os 35 anos de idade e que as curvas de sobrevivência de humanos podiam ser modeladas pelo que atualmente é conhecido como equação de Gompertz (Fig. 44.2):

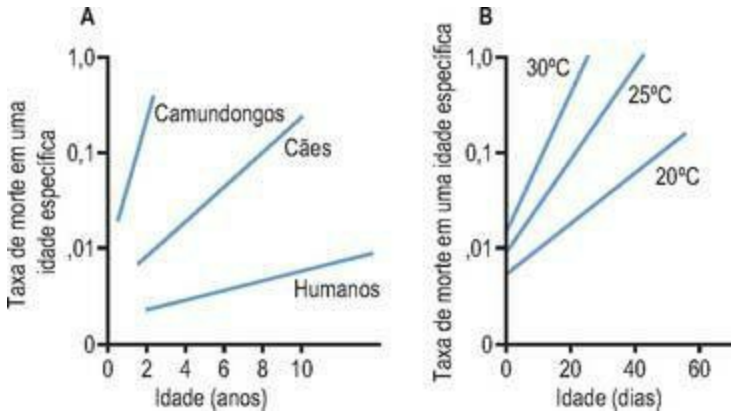


Fig. 44.2 Gráficos de Gompertz para os seres humanos e outras espécies. (A) Humanos e outros vertebrados. (B) Moscas criadas em diversas temperaturas

(adaptado do trabalho de Prof. R.S. Sohal).

$$m_t = Ae^{\alpha t}$$

O termo m_t é a taxa de mortalidade específica por idade na idade t; α é a inclinação, o efeito do tempo na taxa de mortalidade; A, o intercepto no eixo y, é a taxa de mortalidade ao nascimento. A equação de Gompertz-Makeham:

$$m(t) = Ae^{\alpha t} + B$$

adiciona uma constante B, para fazer a correção em relação à taxa de mortalidade independente da idade, por exemplo como resultado da mortalidade infantil ou acidental, e fornecer um melhor ajuste aos dados atuariais.

Os gráficos de Gompertz na Figura 44.2 ilustram as alterações dependentes do tempo na taxa de mortalidade para três diferentes espécies de vertebrados e para moscas mantidas em diferentes temperaturas. Os mamíferos de vida curta têm uma taxa ajustada à idade (α) maior, enquanto a taxa de mortalidade para os poiquilotérmicos varia com a temperatura ambiente – as moscas vivem mais quando crescem em temperaturas mais baixas. Essa observação foi interpretada como evidência para as teorias de envelhecimento "taxa de sobrevivência" ou "teoria do desgaste". As moscas, sendo mais ativas em altas temperaturas, consomem mais energia e morrem mais rápido. As moscas que são mantidas, por exemplo em uma caixa de fósforos em vez de em garrafões maiores, também viveram mais; moscas sem asas vivem mais; moscas machos, segregados das fêmeas, também vivem mais. Em cada caso, em pequenos enclausuramentos, a falta de asas e na ausência do sexo oposto, os machos

são menos ativos, têm taxas metabólicas basais menores e expectativas de vida média e máxima maiores. Nenhuma dessas estratégias para o aumento da expectativa de vida é aplicável aos seres humanos.

TEORIAS DO ENVELHECIMENTO

As teorias do envelhecimento podem ser divididas em duas categorias gerais: biológicas e químicas

As teorias biológicas tratam o envelhecimento como um evento controlado geneticamente, determinado pela expressão programada ou repressão da informação genética. O envelhecimento e a morte são vistos como o estágio final orquestrado pelo nascimento, crescimento, maturação e reprodução. A apoptose (morte celular programada) e a involução tímica são exemplos de eventos geneticamente programados ao nível celular e de órgãos, e o declínio dos sistemas imunológico, neuroendócrino e reprodutivo pode ser observado em um contexto mais amplo como evidência da ação de um relógio biológico que afeta as funções integradas de um organismo. As teorias biológicas atribuem as diferenças na expectativa de vida às diferenças genéticas das interespécies, mas também fornecem uma explicação para a observação de que há um componente genético para a longevidade das espécies – por exemplo, nas famílias com história de longevidade. As diferenças na expectativa de vida entre as espécies também se correlacionam fortemente com a eficiência dos mecanismos de reparo do DNA. As espécies de vida longa têm processos de reparo de DNA mais eficientes (Fig. 44.3). Diversas doenças do envelhecimento acelerado (progeria) também ilustram a importância da genética e a manutenção da integridade do genoma durante o envelhecimento.

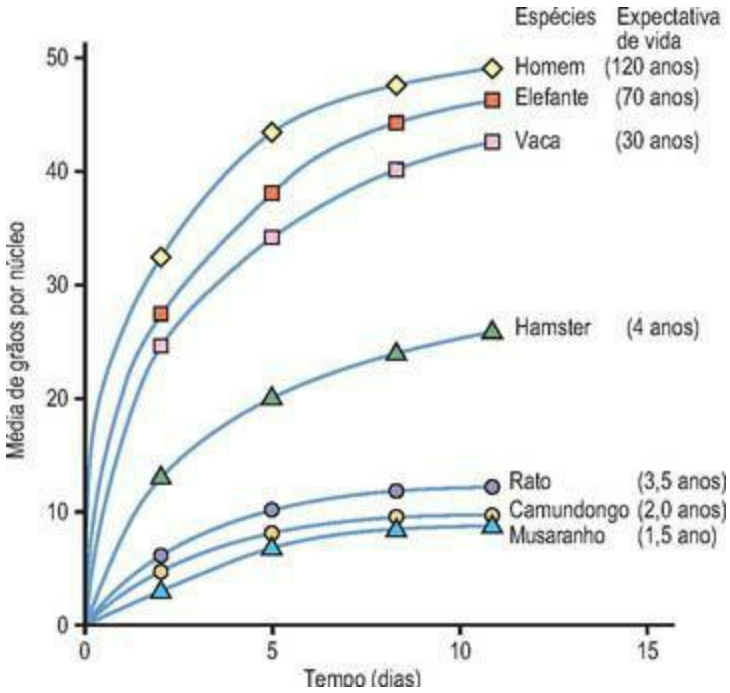


Fig. 44.3 Correlação entre a atividade de reparo do DNA e a longevidade. Fibroblastos de várias espécies foram rapidamente irradiados, formando dímeros de timina e timina glicol (Cap. 31). As bases oxidadas são removidas e substituídas pelo reparo por excisão. O reparo do DNA foi avaliado pela taxa de incorporação de um traçador de [^{3}H]timidina no DNA por autorradiografia

*(adaptado de Hart RW, Setlow RB. Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and life-span in a number of mammalian species. Proc Natl Acad Sci USA 1974; **71**:2169-2173).*

As teorias químicas do envelhecimento o tratam como um processo somático que resulta de danos acumulativos às biomoléculas. Em um extremo, a teoria do erro catastrófico propõe que o

envelhecimento é resultado de erros acumulativos na maquinaria para replicação, reparo, transcrição e tradução da informação genética. Por fim, os erros em enzimas críticas, como a DNA e a RNA polimerase ou as enzimas envolvidas na síntese e na taxa de renovação de proteínas, gradualmente afetam a fidelidade da expressão da informação genética e permitem o acúmulo de proteínas alteradas. A propagação dos erros e o resultante acúmulo das macromoléculas disfuncionais levam por fim ao colapso do sistema. Consistente com essa teoria, quantidades crescentes de enzimas funcionalmente inativas, imunologicamente detectáveis, porém desnaturadas ou modificadas, se acumulam nas células como função da idade.

Teorias químicas mais gerais tratam o envelhecimento como resultado crônico da modificação química (não enzimática) acumulativa, de lesão ou dano de todas as biomoléculas (Tabela 44.2). Da mesma forma que a ferrugem e a corrosão, o acúmulo do dano com a idade gradualmente afeta a função. Esse dano é mais aparente em proteínas de tecidos de vida longa, como as lentes do cristalino e os colágenos extracelulares, os quais acumulam modificações químicas com a idade. Essas proteínas gradualmente tornam-se acastanhadas com a idade, como resultado da formação de uma grande quantidade de compostos conjugados que absorvem na região amarelo-avermelhada do espectro (Fig. 44.4). Também ocorre dano químico à integridade do genoma, porém é mais difícil de ser quantificado por causa da eficiência do processo de reparo que faz a excisão e o reparo dos nucleotídeos modificados. Como pode ser observado na Tabela 44.2, existem diversas consequências silenciosas do dano em DNA. Esse dano é principalmente endógeno, mas é aumentado pela ação de xenobióticos e de agentes ambientais.

Tabela 44.2 Alterações químicas em biomoléculas dependentes da idade. Proteínas de vida longa, como as lentes do cristalino e os tecidos colagenosos, acumulam danos com a idade. A modificação e as ligações cruzadas (*crosslinking*) de proteínas ocorrem como resultado de mecanis-mos não oxidativos (desaminação, racemização) ou oxidativos (proteinas carboniladas) ou por reações de proteinas com produtos de carboidratos ou peroxidação lipídica (glicoxidação, lipoxidação). O dano ao DNA é fre-quentemente silencioso, isto é, formas modificadas de nucleotídeos podem não se acumular, porém o dano aumenta na forma de mutações que resul-tam de erros no reparo

Química e envelhecimento		
Modificação nas proteínas	**Modificação no DNA e mutação**	**Outros**
ligações cruzadas (*crosslinking*)	oxidação	lipofuscina
oxidação	depurinação	enzimas inativas
desaminação	substituições	
D-aspartato	inserções e deleções	
proteínas carboniladas	inversões e transposições	
glicoxidação		
lipoxidação		

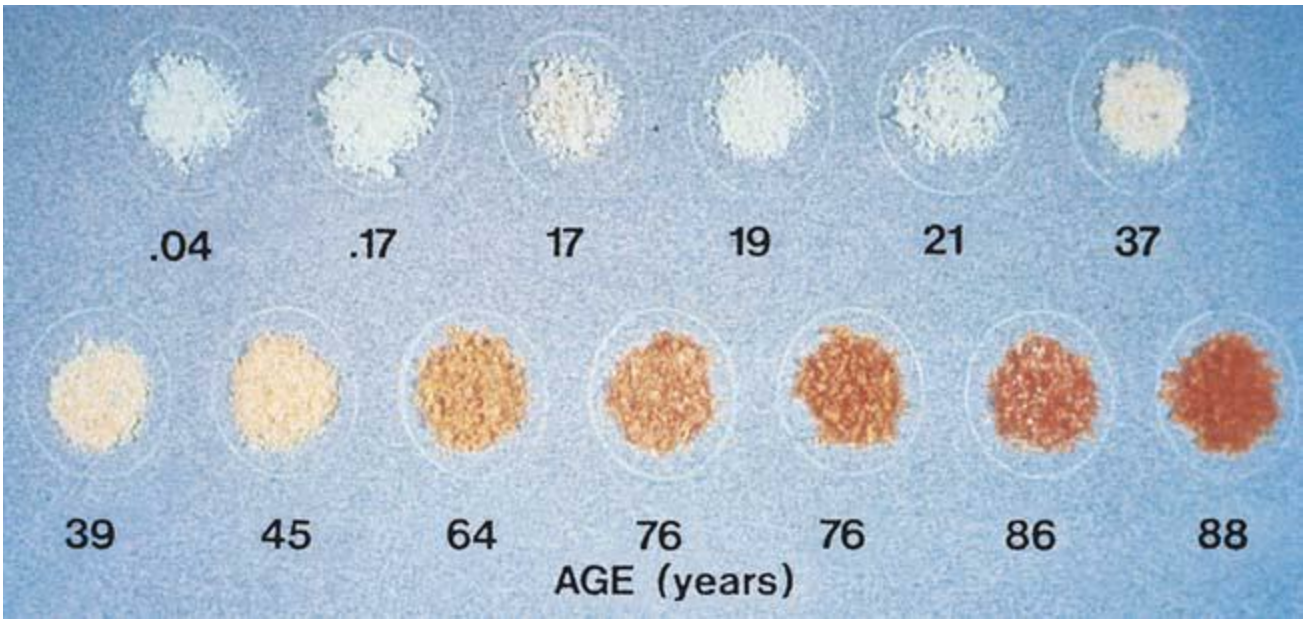


Fig. 44.4 Alterações nas proteínas do cristalino e da cartilagem costal com a idade. O acastanhamento é um aspecto característico do envelhecimento de proteínas, não só no cristalino, o qual é exposto à luz do sol, mas também do colágeno dos tecidos em todo o organismo. As ligações cruzadas (*crosslinking*) de proteínas também aumentam o acastanhamento e contribuem para a insolubilidade gradual das proteínas do cristalino com a idade. Os agregados das proteínas do cristalino dispersam a luz, contribuindo com o desenvolvimento das cataratas "senis". As ligações cruzadas dos colágenos articulares e vasculares diminuem a elasticidade dos discos vertebrais e a flexibilidade da parede vascular com a idade. Essas alterações nas proteínas extracelulares, apresentadas aqui para o colágeno costal, são semelhantes às alterações induzidas pela reação de carboidratos e lipídios com proteínas durante o cozimento de alimentos, um processo conhecido como reação de Maillard ou reação de acastanhamento. Os seres humanos foram descritos como

fornos de baixa temperatura, operando a 37°C, com longos ciclos de cozimento (~75 anos). Muitos dos produtos da reação de Maillard detectados na crosta de pães e de roscas têm sido identificados nos cristalinos e nos colágenos humanos, e aumentam com a idade. (Veja também a discussão a respeito das complicações diabéticas no capítulo 21; AGE (years) = IDADE (anos).

As teorias dos sistemas orgânicos do envelhecimento incorporam vários aspectos das teorias anteriormente descritas. Essas teorias atribuem ao envelhecimento a falência dos sistemas integrativos, como o imunológico, o neurológico, o endócrino e o circulatório. Embora não seja apontada uma causa específica, essas teorias integram as teorias biológicas e químicas, reconhecendo tanto as contribuições genéticas quanto as ambientais.

A teoria do envelhecimento pelos radicais livres

A teoria química do envelhecimento mais amplamente aceita é a teoria do envelhecimento pelos radicais livres (FRTA). Essa teoria trata o envelhecimento como resultado de um acúmulo do dano oxidativo às biomoléculas: DNA, RNA, proteínas, lipídios e glicoconjugados. Sob o ponto de vista da FRTA, os organismos de vida longa têm baixas taxas de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS; Cap. 37), melhores defesas antioxidantes e processos de reparo ou de taxa de renovação (*turnover*) mais eficientes. Embora seja uma teoria química, a FRTA não ignora a importância da genética e da biologia na limitação da produção das ROS e dos mecanismos antioxidantes e de reparo. Essa teoria também se inter-relaciona com outras, como a teoria da taxa de sobrevivência, uma vez que a taxa de geração de ROS é uma função da taxa geral e/ou da extensão do consumo de oxigênio, e a teoria da ligação cruzada entre proteínas (*crosslinkage*) porque alguns produtos das ROS danificam esse tipo de ligação. Finalmente, como uma hipótese química, a FRTA não exclui o acúmulo do dano químico, independentemente das ROS, tal como a racemização e a desaminação de aminoácidos, mas mantém o foco nas ROS como a principal fonte de dano e a causa fundamental do envelhecimento.

A FRTA é sustentada pela correlação inversa entre a taxa de metabolismo basal (taxa de consumo de oxigênio por unidade de peso) e a expectativa de vida máxima de mamíferos, além da evidência de aumento de dano oxidativo às proteínas com a idade. Os grupamentos carbonil das proteínas, tais como o semialdeído glutâmico e o semialdeído α-aminoadípico formados pela desaminação oxidativa da arginina e da lisina, respectivamente, são formados em proteínas expostas às ROS. O nível do estado de equilíbrio de proteínas carboniladas em proteínas intracelulares aumenta de modo logarítmico com a idade e em uma taxa inversamente proporcional à expectativa de vida das espécies. Os fibroblastos de pacientes com progeria (envelhecimento acelerado), por exemplo as síndromes de Werner e de Hutchinson-Gilford, apresentam mais proteínas carboniladas quando comparados aos controles pareados à idade. Concentrações semelhantes de proteínas carboniladas também estão presentes em tecidos de ratos e de humanos idosos, sugerindo que alterações semelhantes ocorrem no envelhecimento em diversos organismos, independentemente da diferença de expectativa de vida.

PROGERIAS: ENVELHECIMENTO ACELERADO COMO RESULTADO DO DEFEITO NO REPARO DO DNA

Determinadas doenças genéticas são consideradas modelos de envelhecimento acelerado (progeria). Essas doenças monogênicas manifestam muitas porém nunca todas as características do envelhecimento normal. Poucos pacientes com progeria desenvolvem demência ou doenças relacionadas com a idade, como a doença de Alzheimer. As progerias são algumas vezes descritas como caricaturas do envelhecimento, porém são modelos úteis para a compreensão do processo de envelhecimento. As síndromes de Werner e de Bloom são doenças autossômicas recessivas causadas por mutações de genes distintos que atuam como helicases do DNA, que têm um papel no reparo do DNA danificado. Os pacientes com a síndrome de Werner têm aparência normal durante a infância, mas param de crescer na adolescência. Gradualmente apresentam muitos sintomas de envelhecimento

prematuro, incluindo o surgimento de cabelo acinzentado e queda de cabelos, afinamento da pele, desenvolvimento precoce de catarata, prejuízo da tolerância à glicose e diabetes, arteriosclerose e osteoporose, além de aumento nas taxas de câncer. O óbito normalmente ocorre entre os 40 e os 50 anos de idade devido à doença cardiovascular. Os fibroblastos dos pacientes com síndrome de Werner dividem-se somente 20 vezes em cultura de células e têm níveis mais altos de grupamentos carbonilas ligados às proteínas, um indicador de aumento de estresse oxidativo.

A síndrome de Bloom é caracterizada pelo aumento da frequência de quebras cromossômicas, nanismo, fotossensibilidade e aumento da frequência de câncer e de leucemia. O óbito normalmente ocorre entre os 20 e os 30 anos de idade. A ocorrência de ataxia-telangiectasia ou síndrome do cromossomo frágil está associada ao aumento da perda dos telômeros na divisão celular e na deficiência no reparo da quebra da dupla fita de DNA. Essa síndrome é causada por um defeito em uma proteína quinase envolvida na transdução de sinal, no controle do ciclo celular e no reparo do DNA. A síndrome de Hutchinson-Gilford é uma forma de progeria pediátrica grave. Os pacientes apresentam muitos dos sintomas da síndrome de Werner, porém os sintomas surgem em idade mais precoce, e o óbito geralmente ocorre entre os 20 e os 30 anos de idade. Essa síndrome é causada por um defeito no gene da lamina, um componente do envelope nuclear. A síndrome de Hutchinson-Gilford é uma das diversas síndromes associadas à mutação da lamina, que causa um aumento na fragilidade nuclear e processamento aberrante do mRNA. Da mesma forma que na síndrome de Werner, a cultura de fibroblastos torna-se prematuramente senescente. Esses tipos de progerias sugerem que um reparo de DNA eficiente é essencial para o envelhecimento normal.

A Figura 44.5 ilustra o acúmulo de dois produtos de oxidação de aminoácidos relativamente estáveis no colágeno da pele humana: o sulfóxido de metionina e a *orto*tirosina. Esses compostos são formados por mecanismos diferentes envolvendo diferentes ROS (Cap. 37) e estão presentes em concentrações significativamente diferentes no colágeno da pele, porém aumentam de acordo com a idade. Outras modificações de aminoácido que se acumulam no colágeno da pele com a idade incluem os produtos finais de glicosilação e de lipoxidação avançada (AGE/ALEs), como a carboximetil-lisina e a pentosidina (Figs. 44.6 e 21.16), e o D-aspartato.

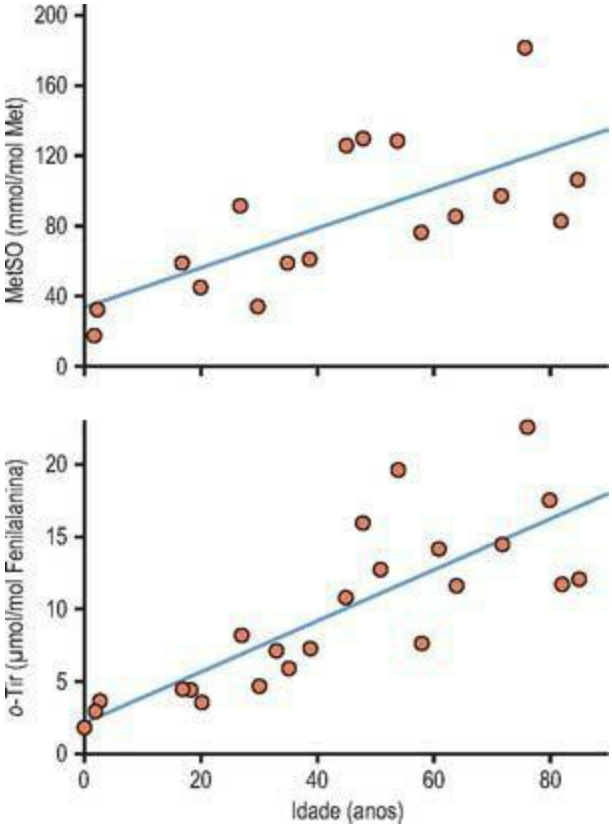


Fig. 44.5 Acúmulo de produtos de oxidação de aminoácidos no colágeno da pele humana com a idade. A metionina é oxidada a sulfóxido de metionina (MetSO) pelo HOCl ou H_2O_2; a *orto*tirosina é um produto da adição do radical hidroxila à fenilalanina. Apesar de uma diferença de 100 vezes na sua taxa de acúmulo no colágeno, os níveis de MetSO e de o-tirosina se correlacionam fortemente um com o outro, indicando que múltiplas ROS contribuem para o dano oxidativo às proteínas

*(adaptado de Wells-Knecht MC et al. Age-dependent accumulation of ortho-tyrosine and methionine sulfoxide in human skin collagen is not increased in diabetes: evidence against a generalized increase in oxidative stress in diabetes. J Clin Invest 1997;**100**:839-846).*

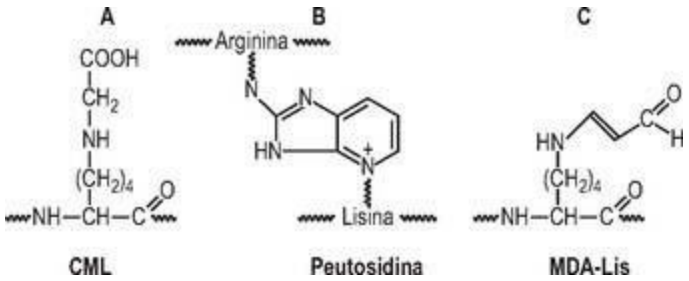


Fig. 44.6 Estrutura dos principais produtos finais de glicoxidação avançada e de lipoxidação (AGE/ALEs). (A) O AGE/ALE, $N^{\varepsilon-}$ (carboximetil)lisina (CML), que é formado durante as reações de peroxidação tanto de carboidratos quanto lipídica. (B) O AGE, pentosidina, uma ligação cruzada fluorescente em proteínas. (C) O ALE, o malondialdeído-lisina (MDA-Lis), um ALE reativo que pode levar à formação de ligações cruzadas de aminoenimina (RNHCH=CHCH=NR) em proteínas (Fig. 21.16).

O D-aspartato é uma modificação não oxidativa da proteína que é formada pela racemização espontânea dependente da idade do L-aspartato, a forma natural do aminoácido nas proteínas. A taxa de renovação mais rápida da pele, quando comparada ao colágeno articular, leva a uma taxa menor de acúmulo de D-aspartato no colágeno da pele com a idade e também explica a diferença nas taxas de acúmulo de AGE/ALEs na pele *versus* o colágeno articular. Os níveis de AGE/ALEs são até mais altos nas lentes do cristalino, que têm a menor taxa de renovação entre as proteínas do organismo. A desaminação da asparagina e da glutamina é outra modificação química não oxidativa em proteínas

que aumenta com a idade, tendo sido principalmente descrita em proteínas intracelulares.

A taxa de acúmulo dessas modificações depende da taxa de renovação dos colágenos (Fig. 44.7) e é acelerado pela hiperglicemia e hiperlipidemia no diabetes e na aterosclerose. Acredita-se que o aumento de AGE/ALEs e a ligação cruzada oxidativa do colágeno prejudiquem a taxa de renovação e contribuam para o espessamento das membranas basais com a idade. O aumento dos níveis de AGE/ALEs no colágeno ajustados à idade está envolvido na patogênese das complicações do diabetes e da aterosclerose. Esses produtos também estão aumentados no tecido encefálico de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer, de Parkinson e de Creutzfeld-Jakob (príon).

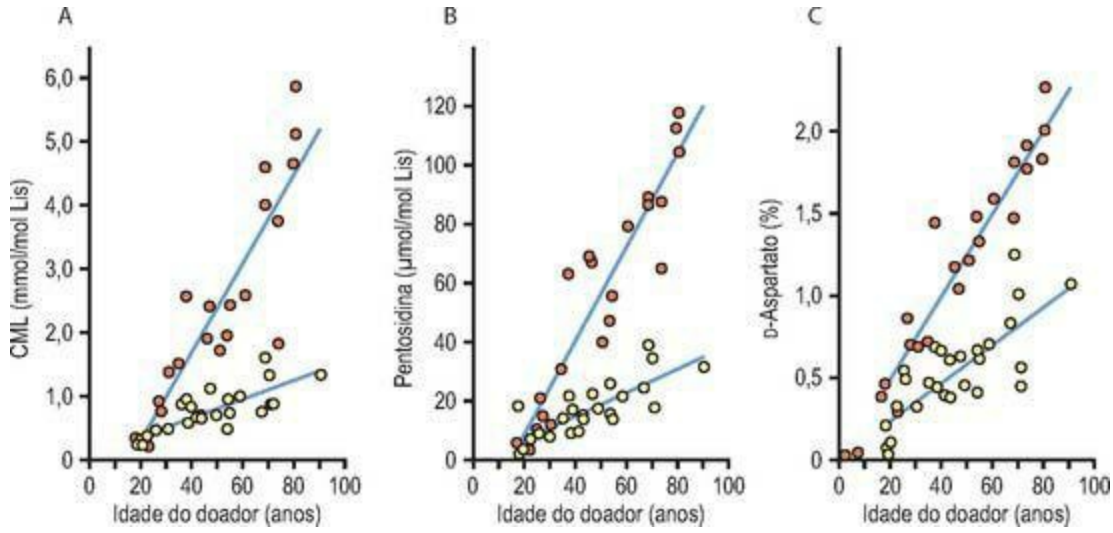


Fig. 44.7 Acúmulo de produtos finais de glicoxidação avançada e de lipoxidação (AGE/ALEs) e de D-aspartato em colágenos com a idade. A N^{ε}-(carboximetil)lisina (CML) é formada por meio de mecanismos oxidativos a partir de proteínas glicadas ou de reações de glicose, ascorbato ou de produtos de peroxidação lipídica com proteínas. A ligação cruzada fluorescente pentosidina é formada pela reação oxidativa de glicose ou de ascorbato com proteínas. O D-aspartato é formado não oxidativamente por racemização de resíduos de L-aspartato em proteínas. As diferenças na taxa de acúmulo tanto dos marcadores oxidativos quanto dos não oxidativos são atribuídas às diferenças nas taxas de renovação dos colágenos

*(adaptado de Verzijl N et al. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation endproducts. J Biol Chem 2000;**275**:39027-39031).*

Apesar de não tão bem caracterizado, o pigmento lipofuscina é um biomarcador característico do envelhecimento. Seu acúmulo ocorre na forma de grânulos fluorescentes, derivados de lisossomos no citoplasma de células pós-mitóticas, em uma taxa inversamente relacionada com a expectativa de vida das espécies. A lipofuscina é resultante do acúmulo de restos não digeridos decorrente de reações entre os peróxidos lipídicos e as proteínas. Ela pode representar 10%-15% do volume do músculo cardíaco e de células neuronais em idade avançada, e sua taxa de deposição nos miócitos cardíacos em cultura de células é acelerada pelo crescimento sob condições de hiperóxia. Nas moscas, a taxa de acúmulo da lipofuscina varia diretamente com a temperatura e a atividade do ambiente, e inversamente à expectativa de vida, de forma consistente com os efeitos dessas variáveis na expectativa de vida (Fig. 44.2B).

Em resumo, existe uma grande variedade de modificações químicas, oxidativas e não oxidativas, que se acumulam em proteínas com a idade. Embora, com frequência, o foco da atenção seja a modificação da proteína, o dano real a partir dos radicais livres e do estresse oxidativo ocorre ao nível do genoma, uma vez que, se o DNA não for reparado corretamente, a célula morrerá, sua

capacidade pode estar prejudicada ou o dano será propagado. O dano ao DNA se acumula não na forma de ácidos nucleicos modificados, mas como erros quimicamente "silenciosos" no reparo – inserções, deleções, substituições, transposições e inversões de sequências de DNA – que afetam a expressão e a estrutura das proteínas. Como o reparo é bem eficiente nos seres humanos quando comparado com outros animais, e a composição do DNA não se altera com o reparo, as mutações do DNA não são detectáveis nos tecidos por meio de técnicas analíticas convencionais. Entretanto, a presença na urina de pirimidinas e de purinas oxidadas fornece evidências de dano oxidativo crônico ao genoma.



BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DO ENVELHECIMENTO

Produtos finais de glicoxidação e de lipoxidação avançadas (AGE/ALEs) são modificações químicas (não enzimáticas) derivadas de carboidratos e de lipídios, e de ligações cruzadas em proteínas. Eles são formados pela reação de proteínas com produtos de oxidação de carboidratos e de lipídios (Fig. 44.6). Alguns compostos, como a N^{ε}-(carboximetil)lisina (CML), podem ser formados tanto a partir de carboidratos como de lipídios; outros, como a pentosidina, são formados exclusivamente a partir de carboidratos, enquanto o aducto de malondialdeído em resíduos de lisina é formado exclusivamente a partir de lipídios. As fontes de carboidratos de AGEs incluem a glicose, o ascorbato e os intermediários glicolíticos; os ALEs são derivados da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados em fosfolípidios. Resíduos de lisina, histidina e cisteína são os principais sítios de formação de AGE/ALE em proteínas. Mais de 30 diferentes AGE/ALEs foram detectados em proteínas teciduais, e sabe-se que muitos deles aumentam com a idade. Os AGE/ALEs são biomarcadores úteis do envelhecimento de proteínas e de sua exposição ao estresse oxidativo.



DOENÇA DE ALZHEIMER:ESTRESSE OXIDATIVO EM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

A doença de Alzheimer (AD) é a forma mais comum de deterioração cognitiva progressiva no idoso. Essa doença é caracterizada microscopicamente pelo surgimento de emaranhados neurofibrilares e de placas senis nas regiões corticais do cérebro. Os emaranhados localizam-se dentro dos neurônios e são ricos em proteína τ (tau), a qual é derivada de microtúbulos, e que se encontra hiperfosforilada e poliubiquitinada. As placas são compostas de agregados extracelulares, localizados em torno dos depósitos amiloides, formados a partir de peptídeos insolúveis derivados de uma família de proteínas precursoras amiloides. A AD afeta principalmente os neurônios colinérgicos, e os fármacos que inibem a degradação da acetilcolina dentro das sinapses constituem a base do tratamento. Uma abordagem similar é utilizada na preservação da dopamina nos neurônios dopaminérgicos na doença de Parkinson, isto é, por meio da inibição de sua enzima de biotransformação, a monoamino oxidase. Diversos estudos mostraram que tanto os AGEs quanto os ALEs estão aumentados nos emaranhados e nas placas no cérebro de pacientes com AD, quando comparados com os controles pareados por idade. Outros indicadores de estresse oxidativo generalizado no cérebro de pacientes com AD incluem aumento dos níveis de proteínas carboniladas, nitrotirosina e 8-OH-deoxiguanosina, sendo que todos esses marcadores são detectados por métodos

imuno-histoquímicos. A proteína amiloide é tóxica aos neurônios em cultura de células e parece promover estresse oxidativo e respostas inflamatórias nas células gliais. Quantidades significativas de ferro com atividade redox ativa, descompartimentalizado, também são detectáveis histologicamente no cérebro de pacientes com AD e podem ser removidas, de forma reversível (*in* vitro), pelo tratamento com quelantes, tal como a deferoxamina. Com base nesses dados, o estresse oxidativo é fortemente envolvido no desenvolvimento e/ou na progressão da AD, e o uso de quelantes está sendo clinicamente avaliado em seu tratamento. Estudos epidemiológicos também indicam que o tratamento de longo prazo com fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, como o ibuprofeno e o Tylenol®, podem reduzir o risco da AD e retardar seu início ou sua progressão.

ENVELHECIMENTO DO SISTEMA CIRCULATÓRIO

A matriz extracelular da aorta e das principais artérias torna-se mais espessa e com mais ligações cruzadas com a idade, contribuindo tanto para a diminuição da elasticidade quanto da capacidade do endotélio em dilatar os vasos sanguíneos em resposta aos estímulos físicos e químicos. Essas alterações ocorrem naturalmente com a idade, independentemente da doença, mas podem contribuir para o aumento do risco cardiovascular do idoso. Os AGEs e os ALEs estão envolvidos na ligação cruzada da matriz extracelular vascular, explicando o aumento relacionado com a idade da ligação cruzada arterial no diabetes e na dislipidemia. Uma nova classe de fármacos, conhecida como AGEs-*breakers*, está sendo avaliada clinicamente para a reversão do aumento da rigidez vascular no envelhecimento e na doença.

Teorias mitocondriais do envelhecimento

As teorias mitocondriais do envelhecimento são uma mistura das teorias biológicas e químicas, tratando o envelhecimento como resultado de um dano químico ao DNA mitocondrial (mtDNA). A mitocôndria contém proteínas especificadas tanto pelo DNA nuclear quanto pelo mitocondrial, mas somente 13 proteínas mitocondriais são codificadas pelo DNA mitocondrial. Embora possa parecer trivial, isso inclui subunidades essenciais das três bombas de prótons e da ATP sintase. O mtDNA é especialmente sensível à mutações: a mitocôndria é o principal local de produção de ROS na célula (Fig. 37.4), o mtDNA não é protegido por uma bainha de histonas e a mitocôndria possui capacidade limitada de reparo do DNA.

As doenças mitocondriais normalmente envolvem defeitos no metabolismo energético, incluindo complexo piruvato desidrogenase, piruvato carboxilase, complexos transportadores de elétrons, ATP sintase e enzimas de biossíntese de ubiquinona. Esses defeitos podem ser causados por mutações tanto no DNA nuclear quanto no mitocondrial, mas o mtDNA sofre muito mais mutações do que o DNA nuclear. Tais defeitos frequentemente resultam no acúmulo de ácido lático devido ao prejuízo da fosforilação oxidativa, e podem causar morte celular especialmente nos músculos esquelético (miopatias), cardíaco (cardiomiopatias) e nos nervos (encefalopatias), todos os quais são fortemente dependentes do metabolismo oxidativo. O número de mitocôndrias e as múltiplas cópias do genoma mitocondrial na célula podem fornecer alguma proteção contra a disfunção mitocondrial como resultado da mutação, mas a perda total da função da mitocôndria, e, algumas vezes, do número de mitocôndrias, é um padrão característico do envelhecimento.

MODELOS GENÉTICOS DE AUMENTO DA EXPECTATIVA DE VIDA

O efeito da genética na longevidade rapidamente aparece nos modelos animais. Por exemplo, diferentes linhagens de camundongos variam em mais de duas vezes em relação à expectativa de vida, e existem também diferenças significativas na expectativa de vida de camundongos machos e fêmeas da mesma linhagem criados em condições idênticas. Deficiências em determinados hormônios ou defeitos em seus receptores ou nas vias de sinalização pós-receptor têm um efeito significativo na expectativa de vida de camundongos. Os efeitos mais marcantes são observados nos camundongos anões das linhagens Ames e Snell. Esses camundongos têm defeitos hipofisários diferentes, ambos resultando em secreção insignificante do hormônio do crescimento (GH; estimula a secreção de IGF-1 pelo fígado), do hormônio tireoestimulante e de prolactina (Cap. 39). Ocorre diminuição do peso corpóreo de adultos jovens em aproximadamente 35% e sua expectativa de vida máxima aumenta em cerca de 45% quando comparada com os controles, porém, estranhamente, eles se tornam obesos com a idade. Efeitos semelhantes no peso e na expectativa de vida são observados em camundongos com defeitos em receptores de GH ou de IGF-1 ou na transdução de sinal. Muitas dessas linhagens são frágeis: os anões Ames ou Snell apresentam hipotireoidismo, hipoglicemia, hipoinsulinemia e, baixa temperatura corpórea. Esses camundongos têm baixa capacidade reprodutiva, são mais suscetíveis às infecções e necessitam de condições de habitação especiais para manter a temperatura corpórea. O tratamento do hipotireoidismo nos anões Snell levou à restauração de uma expectativa de vida quase normal, embora a hipofisectomia de ratos jovens aumente sua expectativa de vida máxima em 15%-20%. Assim, três hormônios que possuem efeito marcante no metabolismo e no crescimento [hormônio do crescimento, IGF-1 (e insulina) e tiroxina] também têm efeitos importantes na expectativa de vida.

TELÔMEROS: UM RELÓGIO DO ENVELHECIMENTO

Os telômeros são sequências repetitivas localizadas nas extremidades do DNA cromossômico, tipicamente compostas de centenas de cópias de pequenas repetições de DNA altamente redundantes, que no ser humano é TTAGGG (Cap. 31). A DNA polimerase necessita de um molde de dupla fita para replicação; iniciadores (*primers*) de RNA na porção final 5′ do molde servem para dar início à síntese de DNA. Entretanto, na extremidade final dos cromossomos, a síntese de DNA é limitada, uma vez que não existem sequências adicionais que sirvam para dar continuidade à ação da DNA primase. Assim, cada ciclo de replicação cromossômica resulta em um encurtamento do cromossomo. A enzima telomerase é uma transcriptase reversa que contém RNA com uma sequência complementar à do DNA dos telômeros. Sua função é manter o comprimento dos telômeros na porção 3′ dos cromossomos. A telomerase é encontrada em tecidos fetais, células germinativas adultas e células tumorais, porém as células somáticas de organismos multicelulares não têm atividade telomerase. Isso levou à hipótese de que o encurtamento dos telômeros pode contribuir para o limite de Hayflick e de que está envolvido no envelhecimento dos organismos multicelulares. O aumento da expressão da telomerase em células humanas resulta no alongamento dos telômeros e no aumento da

longevidade dessas células em pelo menos 20 duplicações celulares. As células de indivíduos com doenças de envelhecimento prematuro (progeria) também têm encurtamento dos telômeros. Ao contrário, as células cancerosas, que são imortais, expressam uma atividade telomerase ativa. Todas essas observações sugerem que a diminuição do comprimento dos telômeros está associada à senescência celular e ao envelhecimento. Camundongos *knockout*, nos quais o gene telomerase foi deletado, têm cromossomos com falta de telômeros detectáveis. Esses camundongos têm alta frequência de aneuploidia e de anormalidades cromossômicas. A doença disceratose congênita autossômica é caracterizada por mutação no locus da telomerase, que leva à incapacidade das células somáticas em reconstituir seus telômeros, o que acarreta a perda da epiderme e da medula hematopoética. Essa doença tem muitas das características do envelhecimento acelerado.

ENVELHECIMENTO DO MÚSCULO:DANO AO DNA MITOCONDRIAL

A idade avançada é caracterizada por uma diminuição generalizada da massa e da força da musculatura esquelética (sarcopenia), como resultado da diminuição, tanto do número de neurônios motores quanto do número e do tamanho das fibras musculares. A perda das fibras é acompanhada de um aumento do tecido conectivo fibroso intersticial e da redução da densidade capilar, que limita o suprimento de sangue. A diminuição da massa e da força muscular contribui para a fragilidade e o aumento do risco de mortalidade. A perda da massa da musculatura esquelética também pode contribuir para a intolerância à glicose no idoso, como resultado da diminuição da massa de tecido disponível para captar glicose do sangue.

Uma das principais alterações na bioquímica do músculo, com a idade, é o aumento no número das células musculares com mitocôndrias deficientes em citocromo oxidase, o que limita a capacidade de trabalho do músculo. Com a diminuição da eficiência da mitocôndria em oxidar o NADH, elas se tornam mais reduzidas, e o acúmulo de ubiquinona (semiquinona) parcialmente reduzida promove a redução do oxigênio molecular, levando ao aumento da produção do ânion superóxido na mitocôndria mais velha (Cap. 37). Sob essas condições, quando a fosforilação oxidativa está prejudicada, as células parecem gerar ATP principalmente por glicólise. O NADH também é oxidado extramitocondrialmente, principalmente pelas NADH oxidases na membrana plasmática, que produzem peróxido de hidrogênio, mas não ATP.

$$\text{NADH oxidase: } NADH + H^+ + O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O_2$$

Essas alterações são observadas tanto no músculo cardíaco quanto no esquelético e parecem resultar de deleções aleatórias importantes no DNA mitocondrial (25%-75% de mtDNA total), que é então amplificado pela expansão clonal, levando à atrofia e fragmentação da fibra. A força da fibra muscular corresponde à sua conexão mais fraca, de tal forma que a perda de pequenas regiões da fibra afeta a capacidade total do músculo. Felizmente, a sarcopenia pode ser retardada e parcialmente revertida pelo exercício de resistência; por isso a ênfase no exercício regular entre os idosos.

Em humanos, o determinante genético mais significativo para a expectativa de vida é o gênero: as mulheres vivem mais do que os homens. A genética responde por aproximadamente 20%-50% da

variabilidade restante da expectativa de vida, e os outros 50%-80% são atribuídos ao ambiente e às variações aleatórias de desenvolvimento. Estima-se que (em 2008) existam menos de 30 genes que têm efeito significativo na expectativa de vida humana. Os cruzamentos entre as populações humanas e as diversas combinações alélicas desses genes podem ofuscar os efeitos observados em linhagens cossanguíneas de vermes ou de roedores. Entretanto, existe um relato recente de que judeus ashkenazi que vivem além dos 95 anos de idade tenham maior frequência de mutações no gene do receptor de IGF-1 (IGF-1R). Existem outros genes ou produtos de genes que estão associados ao aumento da longevidade em humanos – por exemplo, variantes de ApoE, ApoC3 e CETP. Entretanto, esses genes parecem aumentar a expectativa de vida média, provavelmente pela modulação dos efeitos cardiovasculares do colesterol da dieta, em vez de causar aumento na expectativa de vida máxima.

INTERVENÇÕES ANTIENVELHECIMENTO – O QUE FUNCIONA E O QUE NÃO FUNCIONA

Suplementos antioxidantes

Com base na FRTA parece razoável especular que a suplementação antioxidante deve ter um efeito na longevidade. Na verdade, entretanto, não existe nenhuma evidência experimental rigorosa, reprodutível, de que os suplementos antioxidantes tenham qualquer efeito na expectativa de vida máxima em humanos ou em outros vertebrados. Ao mesmo tempo, os suplementos antioxidantes, a maior parte dos quais inclui vitaminas, podem melhorar a saúde, particularmente nos indivíduos com deficiências vitamínicas. Assim, espera-se que ocorra algum efeito da terapia antioxidante na expectativa de vida média (e saudável). A impossibilidade de se atingir a expectativa de vida máxima pode resultar do fato de que existem muitos mecanismos para a produção e o controle de radicais livres, e para a inibição e a reversão do dano em biomoléculas. Muitos desses processos dependem da atividade de enzimas que detoxificam as ROS ou regeneram antioxidantes endógenos. Essas enzimas, como a superóxido dismutase e a glutationa peroxidase (Cap. 37), são induzidas como resposta ao estresse oxidativo e também podem estar reprimidas em momentos em que ele se encontra baixo. Assim, o organismo pode responder a fim de manter um balanço homeostático entre as forças pró e antioxidantes (Fig. 37.2), empreendendo esforços para aumentar as defesas antioxidantes. Essa resposta é essencial, por exemplo, na manutenção da atividade bactericida eficaz durante o *burst* respiratório que acompanha a fagocitose.

Restrição calórica

A restrição calórica (CR) é a única intervenção que estende de forma consistente a expectativa de vida máxima em uma variedade de espécies, incluindo os mamíferos, os peixes, as moscas, os vermes e as leveduras. A redução do consumo calórico total é a característica essencial dessa intervenção, isto é, os efeitos benéficos na extensão da expectativa de vida são observados sempre que a CR é aplicada, independentemente da composição dietética, apesar de a intervenção precoce e prolongada ter efeitos mais expressivos. Conforme demonstrado na Figura 44.8, a CR leva a um aumento significativo, tanto da expectativa de vida média quanto da máxima de ratos de laboratório, equivalente ao aumento da expectativa de vida humana em cerca de 180 anos de idade. Ratos sob restrição calórica têm menos fibras musculares com falta de citocromo oxidase e níveis diminuídos de deleções no DNA mitocondrial muscular. Camundongos sob restrição calórica também têm níveis mais baixos de genes induzíveis para a detoxificação hepática, para o reparo do DNA e para a resposta ao estresse oxidativo (proteínas de choque térmico), sugerindo menor taxa de estresse oxidativo e dano às proteínas e ao DNA.

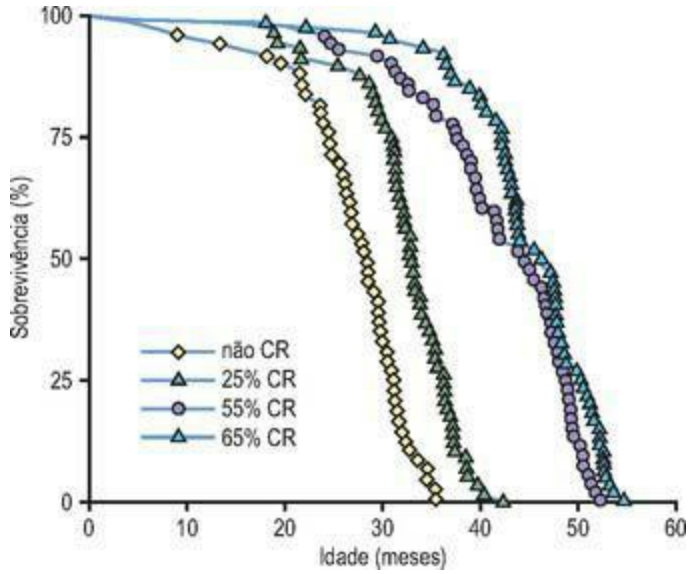


Fig. 44.8 Restrição calórica (CR) aumenta a longevidade em camundongos. O grupo não CR recebeu alimento *ad libitum*. Outros grupos tiveram restrição de 25%, 55% e 65% da dieta *ad lib*, iniciando-se no primeiro mês de vida

*(adaptado de Weindruch R et al. Retardation of aging in mice by dietary restriction. J Nutr 1986;**116**:651-654).*

A CR também retarda o início de uma grande variedade de doenças relacionadas à idade, incluindo o câncer (Fig. 44.9), e é de fato a intervenção de prevenção ao câncer mais potente e de ampla ação em roedores. Argumenta-se que o aumento da expectativa de vida máxima pela CR é alcançada pelo retardo do início do câncer. Animais de vida longa são mais eficientes na proteção de seu genoma, assim retardando o início do câncer, porém a CR pode limitar ainda mais o dano, prevenindo a integridade do genoma e, portanto, levando a uma maior expectativa de vida. Embora a CR não tenha sido testada em humanos, a obesidade é um fator de risco para o câncer em humanos.

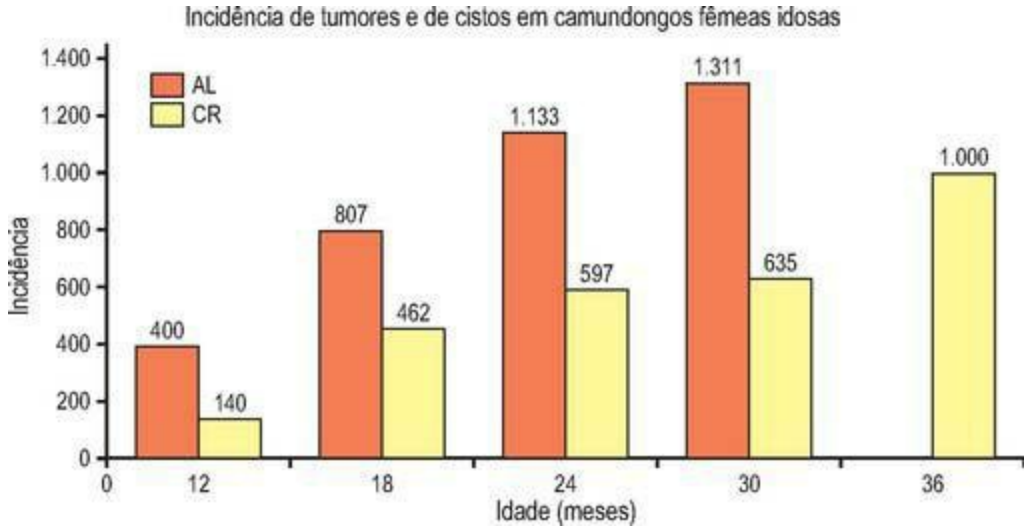


Fig. 44.9 Efeito da restrição calórica (CR) no desenvolvimento de tumores em camundongos. Mais de 1.000 camundongos, na proporção de 50:50 entre machos e fêmeas, de quatro genótipos diferentes foram divididos em dois grupos, um alimentado *ad libitum* (AL), outro recebendo 60% da ingestão calórica do grupo-controle (CR), mas com ingestão comparável de vitaminas, minerais e micronutrientes. Coortes de animais foram eutanasiados em tempos específicos e foram medidas as lesões totais (tumores mais cistos). Aos 24 meses, 51% dos camundongos AL e 13% dos CR tinham tumor, Observe a ausência de tumores nos camundongos controles aos 36 meses – todos os camundongos controles estão mortos! A CR aumentou a expectativa de vida média e máxima dos camundongos e também retardou o início do câncer

*(adaptado de Bronson RT, Lipman RD. Reduction in rate of occurrence of age related lesions in dietary restricted laboratory mice. Growth Dec Aging 1991;**55**:169-184).*

Nos experimentos de CR, tem sido difícil diferenciar entre os efeitos da restrição da dieta no gasto de energia (taxa de sobrevida) *versus* a redução do peso corpóreo que acompanha a restrição calórica. Os camundongos FIRKO (*knockout* para os receptores de insulina no tecido adiposo) te uma diminuição de 15%-25% da massa corpórea, principalmente em função da diminuição de 50% da massa gorda. Entretanto, esses camundongos consomem quantidades idênticas de alimento por dia quando comparados com o grupo-controle; na verdade, mais do que os animais-controle quando normalizados pelo seu peso corpóreo. Eles também têm um aumento de ~20% na expectativa de vida, sugerindo que a diminuição da massa corpórea ou de gordura é mais importante do que o consumo calórico na determinação da expectativa de vida potencialmente máxima. Em outro estudo, a superexpressão da enzima de gliconeogênese, a PEPCK, no músculo esquelético produziu um camundongo mais magro, com 50% do peso corpóreo e 10% de massa gorda, quando comparado com o grupo-controle. Esses camundongos foram sete vezes mais ativos e comeram 60% mais do que os camundongos controles, mas viveram mais tempo e tiveram vida reprodutiva mais longa. De forma geral, a diminuição do peso corpóreo ou da adiposidade durante a CR, em vez de levar a uma diminuição do consumo de alimento, parece ter seu maior efeito no aumento da expectativa de vida. Um resultado geral desses experimentos alimentares e genéticos é que a eficiência mitocondrial, medida como menor taxa de produção de ROS/ATP, parece ser um importante determinante de longevidade.

Os estudos de CR em espécies de primatas de vida longa estão em andamento desde o final dos anos 1980 e existe clara evidência dos benefícios cardiovasculares e na saúde geral dos primatas sob essa dieta, apesar de os efeitos na expectativa de vida máxima ainda não estarem disponíveis. Mesmo se a CR mostrar um aumento da expectativa de vida, é improvável que os seres humanos poderão adotar rigoroso controle da alimentação necessário para esse tipo de dieta. Existem também alguns riscos associados à restrição calórica – por exemplo, a esterilidade e o possível aumento da

suscetibilidade ao estresse ambiental e à infecção microbiana. Entretanto, o conhecimento dos mecanismos biológicos dos efeitos da CR pode levar às estratégias alternativas que mimetizam a CR e aumentam a expectativa de vida.

QUESTÕES DE APRENDIZADO

1. Discuta a natureza das proteínas carboniladas e da lipofuscina, além de sua relevância para o envelhecimento.x

2. Discuta a importância relativa do dano químico às proteínas e ao DNA durante o envelhecimento.

3. Reveja a literatura recente a respeito dos modelos genéticos em camundongos referentes ao envelhecimento de mamíferos e discuta a correlação entre taxa de crescimento, obesidade, restrição calórica e envelhecimento em camundongos.

4. Foi identificada quase uma dúzia de genes que, quando sofrem mutação, aumentam a expectativa de vida dos animais. Por que os genes sem mutação são preservados no *pool* de genes?

5. Discuta as evidências de que a restrição calórica aumenta a expectativa de vida média, saudável e máxima de primatas.

Resumo

O envelhecimento é caracterizado por um declínio gradual da capacidade dos sistemas fisiológicos, levando à falência de um sistema crítico e à morte. Em nível bioquímico, o envelhecimento é considerado o resultado da modificação química crônica de todas as classes de biomoléculas. De acordo com a teoria do envelhecimento pelos radicais livres, as ROS são os principais responsáveis, causando alterações na sequência do DNA (mutações) e da estrutura de proteínas. A longevidade é alcançada pelo desenvolvimento de sistemas eficientes para limitar e/ou reparar o dano químico. A restrição calórica é, atualmente, o único mecanismo amplamente aplicado para retardar o envelhecimento e aumentar a expectativa de vida média, saudável e máxima das espécies. A CR parece funcionar, em parte, inibindo a produção de ROS e limitando o dano às biomoléculas, retardando muitos dos aspectos característicos do envelhecimento, incluindo o câncer.

Leituras sugeridas

Capri M, Salvioli S, Sevini F, et al. The genetics of human longevity. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1067:252-263.

Chomyn A, Attardi G. MtDNA mutations in aging and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304:519-529.

Finch CF. The biology of human longevity: inflammation, nutrition, and aging in the evolution of lifespans. Amsterdam: Academic (Elsevier), 2007.

Harper ME, Bevilacqua L, Hagopian K, Weindruch R, Ramsey JJ. Ageing, oxidative stress, and mitochondrial coupling. *Acta Physiol Scand*. 2004;182:321-331.

Hayflick L. Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann NY Acad Sci*. 2007;1100:1-13.

Rincon M, Rudin E, Barzilai N. Insulin/IGF-1 signaling in mammals and its relevance to human longevity. *Exp Gerontol*. 2005;40:873-877.

Terzioglu M, Larsson NG. Mitochondrial dysfunction in mammalian ageing. *Novartis Foundation Symp*. 2007;287:197-213.

Tosato M, Zamboni V, Ferrini A, Cesari M. The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clin Interv Aging*. 2007;2:401-412.

Ungvari Z, Parrado-Fernandez C, Csiszar A, de Cabo R. Mechanisms underlying caloric restriction and lifespan regulation: implications for vascular aging. *Circ Res*. 2008;102:519-528.

Sites

Restrição calórica Restrição calórica. www.calorierestriction.org.

Palestras sobre Palestras sobre gerentologia:

- www.pathguy.com/lectures/aging.htm
- www.benbest.com/lifeext/aging.html

Progeria Progeria. www.progeriaresearch.org/index.html.

Telâmeros Telâmeros. www.telomeres.net/.

Seleção de faixas de referência de laboratório clínico

Yee Ping Teoh, M.H. Dominiczak

As faixas de referência são valores de uma determinada substância (analito) obtidos em uma população de referência, que geralmente é um grupo de indivíduos saudáveis. Esses valores de referência representam as quantidades fisiológicas de uma substância (concentrações, atividades ou contagens) a serem esperadas em pessoas saudáveis. O termo "faixa de referência" é preferido em vez de "faixa normal" porque a população de referência pode ser claramente definida, enquanto não existe nenhuma definição clara para o que seja "normal" no sentido clínico. O desvio acima ou abaixo da faixa de referência pode estar associado a um processo de doença, e a gravidade do processo de doença pode estar associada a grandeza do desvio.

Quando os dados de um grande grupo de indivíduos saudáveis se encaixam em uma distribuição gaussiana, os limites de referência são definidos como dois desvios padrões acima e abaixo da média. Isso constituiria o intervalo central de 95% da distribuição. A maioria das distribuições dos analitos é, no entanto, não gaussiana, e esses valores geralmente são matematicamente transformados (p. ex., transformação logarítmica, recíproca, exponencial) para produzir uma distribuição gaussiana.

A interpretação dos resultados de testes laboratoriais é baseada na comparação deles com os valores de referência. Se os valores ficam fora do intervalo de referência, isso significa que o resultado varia daquele visto na população de referência. Observe que isso não é necessariamente anormal: por definição, 5% dos indivíduos na população de referência terão resultados fora da faixa de referência (um em 20 indivíduos). Contudo, quanto mais longe o resultado estiver da faixa de referência, maior a probabilidade de que ele esteja associado a uma patologia.

Em alguns casos (como as medições de glicose, lipídios e troponina cardíaca), em vez dos valores de referência, usamos os limites de decisão clínica; estes geralmente são derivados de estudos epidemiológicos correlacionando os níveis de um analito particular com a presença ou o risco de uma doença particular.

Os valores de referência dados aqui são aqueles utilizados nos hospitais da North Glasgow University, Glasgow, Reino Unido, ou são citados em publicações listadas nas Leituras Sugeridas. Ao longo das tabelas, os intervalos são dados em unidades convencionais e do sistema internacional de unidades (SI), juntamente, quando possível, com o fator de conversão das unidades do SI para as convencionais.

Esses valores são dados somente como guia, e o leitor deve sempre checar suas faixas laboratoriais locais antes de interpretar os testes laboratoriais. Lembre também que os testes de laboratório devem sempre ser interpretados no contexto dos dados clínicos derivados de outras fontes, incluindo o histórico médico e o exame físico.

Para converter de uma unidade do SI para uma unidade convencional, multiplique pelo fator de conversão.

Para converter de uma unidade convencional para uma unidade do SI, divida pelo fator de conversão.

A menos que seja indicado, as faixas dadas são para concentrações séricas/plasmáticas.

Gases sanguíneos	Unidades do SI	Fator de conversão (unidade do SI para convencional)	Unidades convencionais
pH arterial	7,37–7,44		
Atividade do íon H^+	36–43 nmol/L		
Pressão parcial do oxigênio arterial (PaO_2)	10,5–13,5 kPa	×7.5	79–101 mmHg
Pressão parcial do oxigênio venoso misturado (PaO_2)	5,5–6,8 kPa	×7.5	41–51 mmHg
Pressão parcial do dióxido de carbono arterial ($PaCO_2$)	4,6–6,0 kPa	×7.5	34–45 mmHg
Bicarbonato arterial	19–24 mmol/l	×1.0	19–24 mEq/L
Excesso de base	±2 mmol/l	×1.0	±2 mEq/L
Gap aniônico ($Na^+ + K^+$) – ($HCO_3^- + Cl^-$)	12–16 mmol/l	×1.0	12–16 mEq/L
Carboxi-hemoglobina	0,005–0,01%		
Meta-hemoglobina	<1,5%		

Eletrólitos séricos e marcadores da função renal	Unidades do SI	Fator de conversão (unidade do SI para convencional)	Unidades convencionais
Sódio	135–145 mmol/L	×1,0	135–145 mEq/L
Potássio	3.5–5.0 mmol/L	×1,0	3.5–5.0 mEq/L
Cloreto	95–108 mmol/L	×1,0	95–108 mEq/L
Bicarbonato	20–25 mmol/L	×1,0	20–25 mEq/L
Ureia	2,5–6,5 mmol/L	×6,02	16.2–39 mg/dL
Creatinina	20–80 umol/L	×0,0113	0.23–0.90 mg/dL
Magnésio	0.7–1.0 mmol/L	×2,43	1.7–2.4 mg/dL
Osmolalidade	285–295 mmol/kg	×1,0	285–295 mOsm/kg

Proteínas séricas, ossos e marcadores da função hepática	Unidades do SI	Fator de conversão (unidade do SI para convencional)	Unidades convencionais
Proteína total	60–80 g/L	× 0,1	6–8 g/dL
Albumina	36–52 g/L	× 0,1	3,6–5,2 g/dL
Globulinas	19–33 g/L Valor calculado = proteína total – albumina)	× 0,1	1,9–3,3 g/dL
Imunoglobulinas:			
IgG	6–16 g/L		
IgA	0,8–4,0 g/L		
IgM	0,5–2,0 g/L		
Proteína C reativa (CRP)	< 95 nmol/L	× 0,105	< 10 mg/L
Haptoglobina	0,2–2 g/L	× 100	20–200 mg/dL
Ferritina	31–450 pmol/L	× 0,445	14–200 µg/L
Fibrinogênio	5,8–11.8 umol/L	× 0,345	2–4 g/L
β_2-microglobulina	1,2–2,4 mg/L		
Cálcio:			
Cálcio total	2,20–2,60 mmol/L	× 4,0	8,8–10,4 mg/dL
Cálcio ionizado	1,1–1,3 mmol/L		4,4–5,2 mg/dL
Fosfato	0,7–1,4 mmol/L	× 3,1	2,2–4,3 mg/dL
Bilirrubina	< 17 µmol/L	× 0,058	<1 mg/dL
Fosfatase alcalina de adultos	50–260 U/L		
Alanina aminotransferase (ALT)	< 50 U/L		
Aspartato aminotransferase (AST)	10–40 U/L		
γ–glutamil transferase (GGT):			
homens	< 90 U/L		
mulheres	< 50 U/L		

Hormônios selecionados	Unidades do SI	Fator de conversão (unidade do SI para convencional)	Unidades convencionais
Hormônio tireoestimulante (TSH)	0,4–4,0 mU/L		
T_4 livre	9–25 pmol/L	× 0,08	0,7–2,0 ng/dL
T_4 total	55–144 nmol/L	× 0,08	4,4–12 µg/dL
T_3 livre	3,5–6,5 pmol/L	× 65	228–422 pg/dL
T_3 total	0,9–2,8 nmol/L	× 0,65	0,6–1,8 ng/mL
Cortisol (plasma):			
às 8 h	190–690 nmol/L	× 0,036	7-15 µg/dL
às 24 h	< 50 nmol/L		< 2 µg/dL
cortisol urinário livre	< 250 nmol/24 h		< 9 µg/dL
Teste curto do Synacthen:			
cortisol basal	> 225 nmol/L	× 0,036	8 µg/dL
incremento	> 200 nmol/L		7 µg/dL
cortisol 30 min	> 500 nmol/L		18 µg/dL
Adrenocorticotropina (ACTH)	< 17,6 pmol/L	× 4,55	< 80 ng/L
Aldosterona:			
supina	83–271 pmol/L	× 0,03	3–10 ng/dL
vertical	139–832 pmol/L		5–30 ng/dL
Atividade da renina plasmática:			
supina	0,51–2,64 ng/ml/h		
vertical	0,98–4,18 ng/ml/h		
Hormônio folículo estimulante (FSH):			
fase folicular	3–13 U/L	× 1,0	3–13 mIU/mL
fase do meio do ciclo	9–18 U/L		9–18 mIU/mL
fase lútea	1–10 U/L		1–10 mIU/mL
pós-menopausa	18–150 U/L		18–150 mIU/mL
Hormônio luteinizante:			
fase folicular	2–15 U/L	× 1,0	2–15 mIU/mL
fase do meio do ciclo	22–90 U/L		2–2 mIU/mL
fase lútea	1–19 U/L		1–19 mIU/mL
pós-menopausa	16–64 U/L		16–64 mIU/mL
Prolactina:			
homens	< 400 mU/L		
mulheres	< 630 mU/L		
Progesterona (meio da fase lútea)	> 20 nmol/L	× 0,33	> 6,4 ng/mL
17-hidroxiprogesterona	< 50 nmol/L	× 0,32	< 16 pg/L
Gonadotrofina coriônica humana (hCG)	< 5 U/L Varia com a idade gestacional		
Testosterona:			
homens (< 50 anos)	10–36 nmol/L	× 28,8	288–1.038 ng/dL
mulheres (< 50 anos)	1,0–3,2 nmol/L		29–92 ng/dL
Globulina de ligação de hormônios sexuais:			
homens (< 50 anos)	6–45 nmol/L	× 0,012	0,7–3,1 µg/ml
mulheres (< 50 anos)	30–120 nmol/L		3,4–13,5 µg/ml
Insulina	< 13 mU/L indetectável na hipoglicemia	× 6,9	< 90 pmol/L

Hormônios selecionados	Unidades do SI	Fator de conversão (unidade do SI para convencional)	Unidades convencionais
Peptídeo C	0,36–1,12 nmol/L	× 3	1,1–3,4 ng/mL
Hormônio da paratireoide	1,1–6,9 pmol/L	× 9,16	11–69 pg/mL
Peptídeo natriurético cerebral (BNP):			
NT-proBNP (< 75 anos)	< 125 pg/mL		
BNP	< 100 pg/mL		

Elementos-traço, proteínas ligadoras de metais e vitaminas	Unidades do SI	Fator de conversão (unidade do SI para convencional)	Unidades convencionais
Ceruloplasmina	200–450 mg/L	× 100	20–45 mg/dL
Cobre	10–22 μmol/L	× 6,54	65,4–144 μg/L
Zinco	9–20 μmol/L	× 6,5	78–118 μg/dL
Selênio	0,8–2,0 μmol/L	× 79	6–16 mg/dL
Ferro	10–30 μmol/L	× 5,59	56–167 μg/dL
Transferrina	2,2–4,0 μmol/L	× 0,8	1,8–3,2 g/L
Ferritina			30–280 mg/L
Vitamina A	1,05–2,8 μmol/L	× 28,6	30–80 μg/dL
Vitamina B_1 (como difosfato de tiamina dos eritrócitos)	275–675 ng/g Hb		
Vitamina B_2 (flavina adenina nucleotídeo)	220–410 nmol/L	× 0,038	8,4–15,6 μg/dL
Vitamina B_6 (fosfato piridoxal)	20–140 nmol/L	× 0,247	4,9–34,6 ng/mL
Vitamina C (ácido ascórbico)	15–90 μmol/L	× 0,176	2,6–15,8 mg/L
25-hidroxi vitamina D	25–170 nmol/L	× 0,4	10–68 μg/L
Vitamina E (tocoferol)	15–45 μmol/L	× 0,43	6,5–19,4 μg/mL
Vitamina B_{12}	138–780 nmol/L	× 1,36	187–1.060 ng/L
Folato	12–33 μmol/L	× 0,442	5,3–14,6 μg/L

Monitoramento de droga terapêutica	Unidades do SI	Fator de conversão (unidade do SI para convencional)	Unidades convencionais
Carbamazepina	1,0–2,8 μmol/L	× 4,2	4,0–12,0 mg/L
Digoxina	1,0–2,6 nmol/L	× 0,78	0,5–2,0 μg/L
Gentamicina:			
vale	< 4 μmol/L	× 0,48	<2 mg/L
1 hora após a dose	10,4–21 μmol/L		5–10 mg/L
Lítio	0,6–1,0 mmol/L	× 1,0	0,6–1,0 mEq/L
Fenitoína:			
adultos	40–80 μmol/L	× 0,25	10–20 mg/L
neonatos	25–40 μmol/L		6,25–10 mg/L
Fenobarbitona:			
adultos	60–180 μmol/L	× 0,23	14–41 mg/L
neonatos	60–120 μmol/L		14–28 mg/L
Teofilina:			
adultos	55–110 μmol/L	× 0,18	10–20 mg/L
neonatos	28–55 μmol/L		5–10 mg/L
Valproato de sódio	350–700 μmol/L	× 0,14	50–100 mg/L
Vancomicina:			
	< 7,0 μmol/L	× 1,44	<10 mg/L
vale 2 h após o final da infusão	12,5–18 μmol/L		18–26 mg/L

Analitos nos quais os limites de decisão clínica são usados	Unidades do SI	Fator de conversão (unidade do SI para convencional)	Unidades convencionais
Colesterol total (desejável)	≤ 4,0 mmol/L	× 38,6	≤ 155 mg/dL
LDL-colesterol (ótimo) (LDL calculado = Col – HDL-C – 0,46 × TG)	≤ 2,0 mmol/L	× 38,6	≤ 77 mg/dL
HDL-colesterol (desejável)	≥ 0,0 mmol/L (homens) ≥ 1,2 mmol/L (mulheres)	× 38,6	40 mg/dL 46 mg/dL
Triglicerídeos (desejável)	≤ 1,7 mmol/L	× 88,4	< 150 mg/dL
Glicose:			
faixa normal (plasma)	4,0-6,0 mmol/L	× 18	72–109 mg/dL
jejum	< 6,1 mmol/L		< 110 mg/dL
glicose prejudicada no jejum	≥ 6,1 mmol/L mas <7,0 mmol/L		≥ 110 mg/dL mas <126 mg/dL
diabetes	≥ 7,0 mmol/L		≥ 126 mg/dL
Hemoglobina glicada (DCCT calibrada) Controle glicêmico aceitável	< 7% (varia com o tipo de paciente)		
Troponina cardíaca:			
troponina I	< 0,1 μg/L	× 1,0	< 0,1 ng/mL
troponina T	< 0,1 μg/L	× 1,0	< 0,1 ng/mL

Para obter mais detalhes sobre os valores lipídicos e objetivos do tratamento, acesse http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/atp3xsum.pdf (recomendações americanas) e http://www.bcs.com/download/651/JBS2final.pdf (recomendações inglesas).

Neurotransmissores e seus metabólitos	Unidades do SI	Fator de conversão (unidade do SI para convencional)	Unidades convencionais
Norepinefrina:			
plasma	1.094–1.625 pmol/L	0,169	185–275 ng/L
urina	< 900 nmol/24 h		< 152 mg/24 h
Epinefrina:			
plasma	164–464 pmol/L	0,182	30–85 ng/L
urina	< 230 nmol/24 h		< 42 mg/24 h
Ácido vanililmandélico urinário	< 35,5 mmol/24 h	0,198	< 7,0 mg/24 h
Ácido 5-hidroxi indol acético urinário (5-HIAA)	10–52 mmol/24 h	0,191	3-14 mg/24 h

Miscelânea	Unidades do SI	Fator de conversão (unidade do SI para convencional)	Unidadess convencionais
Creatina quinase	210 U/L		
Amilase	0–100 U/L		
Urato:			
macho	0,2–0,5 mmol/L	× 16,8	5,0–8,0 mg/dL
fêmea	0,1–0,4 mmol/L		2,5–6,2 mg/dL
Amônia	15–88 μmol/L	× 1,7	25–150 μg/dL
Lactato	0,7–1,8 mmol/L	× 9,0	6–16 mg/dL
Porfobilinogênio urinário	< 9 μmol/24 h	0,226	< 2 mg/24 h

Fluido cerebroespinhal (CSF)	Unidades do SI	Fator de conversão (unidade do SI para convencional)	Unidades convencionais
Proteína	< 0,45 g/L		
Glicose	3,3–4,4 mmol/L (normal > 65% da glicose plasmática)	18,0	59–79 mg/dL
Lactato	< 2,2 mmol/L	× 9,0	<20 mg/dL

Urina	Unidades do SI	Fator de conversão (unidade do SI para convencional)	Unidades convencionais
Microalbumina			
Razão albumina/creatinina: homens mulheres	< 20 mg/L ACR < 2,5 mg/mmol creat ACR < 3,5 mg/mmol creat		
Taxa de excreção de albumina	AER < 20 μg/min		
Sódio	75–300 mmol/24 h	× 1,0	75–300 mEq/L
Potássio	40–100 mmol/24 h	× 1,0	40–100 mEq/ 24 h
Cloreto	100–250 mmol/24 h	× 1,0	150–250 mEq/24 h
Ureia	420–720 mmol/24 h	× 0,028	11,8–20,2 g/24 h
Cálcio	2,5–7,5 mmol/24 h	× 40	100–300 mg/24 h
Magnésio	2,5–8,0 mmol/24 horas	× 24,3	61–194 mg/24 h
Fosfato	10–40 mmol/24 h	× 0,03	0,31–1,24 g/24 h
Cobre	0,2–0,6 μmol/24h	× 6,54	1,3–3,9 μg/24 h
Creatinina	9–18 mmol/24 h	× 0,11	1,0–2,0 g/24 h
Osmolaridade	50–1.200 mmol/kg	× 1,0	50–1.200 mOsm/kg

Intervalos de referência para testes hematológicos	Unidades do SI	Unidades convencionais
Hemoglobina:		
homens	8,1–11,2 mmol/L	13,0–18,0 g/dL
mulheres	7,4–9,9 mmol/L	12,0–16,0 g/dL
recém-nascidos	10,2–12,1 mmol/L	16,5–19,5 g/dL
crianças	7,0–10,2 mmol/L	11,2–16,5 g/dL
Hematócrito	41–46%	41–46 mL/dL
Hemoglobina corpuscular média (MCH)	26–34 pg/célula	26–34 pg/célula
Volume corpuscular médio (MCV)	80–96 fL	80–96 μm^3
Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC)	320–360 g/L	32–36 g/dL
Contagem de hemáceas:		
homens	4,4–5,9 × 10^6/mL	4,6–6,2 milhões/mm^3
mulheres	3,8–5,2 × 10^6/mL	3,8–5,2 milhões/mm^3
Leucócitos, total	4,0–11,0 × 10^9/L	4.000–11.000/ mm^3
Leucócitos, contagem diferencial:		
neutrófilos	2–7,5 × 10^9/L	45–74%
linfócitos	1,3–4 × 10^9/L	16–45%
monócitos	0,2–0,8 × 10^9/L	4,0–10%
eosinófilos	0,04–0,4 × 10^9/L	0,0–7,0%
basófilos	0,01–0,1 × 10^9/L	0,0–2,0%
Plaquetas	150–400 × 10^9/L	150.000–400.000/mm^3
Reticulócitos	25–75 × 10^9/L	0,5–1,5% dos eritrócitos

Intervalos de referência para testes hematológicos	Unidades do SI	Unidades convencionais
Taxa de sedimentação de eritrócitos (ESR)	2–10 mm/h	
Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT)	30–50 s	
Tempo de protrombina (PT)	10-15 s	
INR Faixa terapêutica (difere de acordo com a condição-base)	0,9-1,2 2,0-4,0	
Tempo de coagulação da trombina	11-18 s	
Fibrinogênio	2,0-4,0g	200-400 mg/dL
Tempo de sangramento (padrão)	2,0-10,0 min	2,0-10 min
d-Dímero	<0,25 g/L	

Leituras sugeridas

Bakerman S. Bakerman's ABC of interpretive laboratory data, 4th edn, Scottsdale, AZ: Interpretive Laboratory Data; 2002:580. Comment:

Burtis C, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry, 3rd edn, Philadelphia: Saunders; 1999:1917. Comment:

Dominiczak MH. Seminars in clinical biochemistry. Glasgow: University of Glasgow, 1997;415. Comment:

Jakob M. Normal values pocket book. Hermosa Beach, CA: Borm Bruckmeier, 2002;220. Comment:

Índice

Nota: Os números de páginas relacionados a um contexto não textual como Figuras ou Tabelas estão em *itálico*.

A

A23187 (ionóforo), 88

ABCA1 (transportador), 210-211, 224

ABCG1 (transportador), 224

ABCG5 (pseudotransportador), 206

ABCG8 (pseudotransportador), 206

abetalipoproteinemia, 228

absorção
- de carboidratos, 118-121
- de lipídios, 121-124
- de proteínas, 124-126
- definição de, 115
- intestinal, inibidores da, 235

abstinência, 398

acetaldeído, 67

acetaminofen (paracetamol)
- e falência hepática, 398
- hepatotoxicidade do, 396
- metabolismo do, *396*
- overdose, 81

acetato, 70

acetil-CoA, 2
- a partir da via cetogênica, 189-192
- biossíntese do colesterol, 206
- carboxilação da, 195-196
- carboxilase, 195
- catabolismo peroxissomal dos ácidos graxos, 188
- conversão a malonil-CoA, *196*
- e a gliconeogênese, 169
- e a lançadeira do malato, 198
- e o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), 173-174, 175
- e o metabolismo oxidante, 185

e os ácidos graxos, 186, 188, 195
fontes metabólicas de, *174*
produto de vias catabólicas, 173-174
remoção do excesso de, 190

acetil-CoA carboxilase, 195-196

acetil-coenzima A *See* Acetil-CoA

acetilcolina (ACh)
como neurotransmissor, 573, 587-588
e envenenamento por inseticida, 70
nomeando agonistas e antagonistas da, *574*

acetilcolinesterase, 70

aciclovir, 69

acidente vascular cerebral
e HRT, 545
episódios semelhantes a (MELAS), 113
na doença de Fabry, 374

ácido acético, 67

ácido acetilsalicílico (aspirina), 67, 76, 77

ácido araquidônico
e ácidos graxos, 29
precursor de eicosanoides, 564-565
regulando as fosfolipases, 563-564

ácido ascórbico, 111, 138, 298

ácido aspártico, 8, 13

ácido bongkréquico, 112

ácido carboxílico, 9

ácido desoxirribonucleico (DNA), 2, 16, 19
aminoácidos, 5, 6
amplificação e clonagem, 467-471
celular, 467-468, *469*
enzimática (livre de célula), 467
sistemas de vetor para, 469
análise ChIP-on-chip (ChIP-chip), 486-487, *488*

análise, da metilação, *487*
anelamento, 461
compactação nos cromossomos, 416
dano
 no envelhecimento, 616
 reparo do, 613
 tipos de, 419-420
depurinação, 420
desaminação, 420
deslocamento do corte (*nick translation*), 463
detecção de variação em
 eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), 475-476, *477*
 polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP), 474-475
dúplex, 415-416
e ácido fólico, 136
e genoma humano, 415
estrutura do, 413-416
formas alternadas de, 414-415
genômico, 464-467
hibridização *See* hibridização
marcação de sondas
 deslocamento do corte (*nick translation)*, 463
 marcação com base na polimerase (*polymerase-base labeling*), 462-463
 marcação final (*end-labeling*), 462
metilação, 454-455
 análise, *487*
mitocondrial, 415-416
modelo de Watson e Crick do, 413
molde, *463*, 468
monitoramento para dano, 598-599
motivos (*motifs*) de ligação, 451
mutante, detectado pelo método de DGGE, *477*
pareamento de bases Watson e Crick no, *414*
pirossequenciamento, 477
quebra de fitas (*strand breaks*), 420-421
recombinante, 2, 467-468
 tecnologia, 461-479
reparo por excisão, 420
repetições microssatélites, 473-474
replicação
 e análogos de nucleosídios, 69
 em eucariotos, 418-419
 separação/cópia das fitas, 416-419
 sítio, 417-418
revisão, 437

satélite, 415
sequenciamento
didesoxinucleotídios (ddNTPs), 470, *478*
terminação da cadeia (método de Sanger), 476-477, *483*
síntese, *418*, 594
sondas, *462*
Southern blotting do, 464-465
temperatura de desnaturação (Tm), 462
testes, 461
tridimensional, 413

ácido di-hidrofólico, 136

ácido esteárico, 28

ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 33

ácido fólico
deficiência, 136-137
e reações de transferência de um único carbono, 136
e síntese de DNA, 136

ácido fosfatídico
formação e conversão, *368*
precursor dos fosfolipídios *28*, 367

ácido glicurônico, *26*

ácido glutâmico, 8, 13

ácido graxo sintase, 196, *197.*, 198
estrutura da, *197*
reações catalisadas pela, *197*

ácido hialurônico, *27.*, 384

ácido hidroclorídrico (HCl), 18

ácido lipoico, na PDC, *177*

ácido mevalônico
biossíntese de, *207*
na síntese de colesterol, 207

ácido oleico, 18 carbonos, 298

ácido palmítico, 28

ácido pantotênico, 136

ácido pantotênico, e ciclo do TCA, 176

ácido retinoico, 129, 130

ácido ribonucleico (RNA), 2
anatomia molecular do, 424-426
classes gerais de, *423*
de interferência (RNAi), 432, 457
degradação seletiva do, 432-433
edição em nível pós-transcricional, 455-457
hairpin loop (grampo), *424*
inativação do, 432-433
marcação de sondas, 462-467
mensageiro (mRNA), 423
splicing alternativo, 455
polimerases, 426
processamento, *430*
processamento do pré-mRNA, 430-432
ribose no, *26*
ribossomal (rRNA), 423
sondas de, *462*
splicing do, *431*
transcrição do, 427
alongamento, 427-428
mRNA, 426-428
terminação, 428
transcrito de pré-rRNA, 428-430
transcrito de pré-tRNA, 428-430

ácido ribonucleico (RNA), de transferência (RNAt), 423

ácido úrico
de purinas humanas, 404, 406-407
formação endógena de, 407-408

ácido γ-aminobutírico (GABA), 584-585

ácidos biliares
circulação êntero-hepática de, 213
e digestão de gordura da dieta *124*, 213
e metabolismo de colesterol, 211, 394
e metabolismo de gordura, 394
e sais biliares, 122
estrutura dos, *212*

formação dos, 138
secundária, formação dos, no intestino, 213
síntese dos, 211-213

ácidos graxos
alongamento dos, 199
armazenamento de, 200-201, 265
ativação dos, 124
para transporte para a mitocôndria, 185-186
cadeia longa, 29, *123*
transporte de, 36
cadeia longa, transporte de, *186*
cadeia média, 123, 186
oxidação defeituosa da, 188
cadeia ramificada, 188
catabolismo de
cadeia ramificada, 188
peroxissomal, 188
como moléculas sinalizadoras, 297
como surfactantes, 122
comprimento da cadeia, 123
comprimento dos, 186, 196, 198
concentrações plasmáticas dos, *190*
de cadeia curta, 123, 186
de cadeia ímpar, 188
dessaturação dos, 199-200
essenciais, 200
estrutura dos, *27*
gliconeogênese, 156
glicose, incapacidade de ser sintetizada a partir, 168
hidrofóbicos, 36
insaturados, 26, *27*, 28
produção de $FADH_2$ a partir de, *188*
ligação dupla *cis*, 26, 298
ligações duplas, 26
lipídios, digestão, 118
livres (FFA), 219
metabolismo dos, *186*
monoinsaturados, 26, 298
ômega-3, 235
oxidação, 113, 186-189
poli-insaturados (PUFA), 26
ponto de desnaturação, 26, *27*
saturados, 26, 28
síntese de, 195-200

a partir do acetil-CoA, 195
trans, 28, 298
transporte de, 200-201
vias de oxidação alternativa, 188-189
α-oxidação dos, 188
β-oxidação dos *187*, 189
β-oxidação mitocondrial dos, 186
φ-3, 26, 200, 298
φ-6, 26, 200, 298

ácidos, conjugados, 9

ácidos monocarboxílicos, 8

ácidos nucleicos, 2, 136

acidose
lática, 113
metabólica, 66
tubular renal, 92

acidose respiratória, 329

acidúria dicarboxílica, 189

acidúria metilmalônica, 137

acil-CoA: colesterol aciltransferase (ACAT), 206

acil-CoA graxa sintetase, *185*

acil-CoA sintase, 124

aconitase, 179

acrodermatite êntero-hepática, 140

acromegalia, 547

actina, 256, 594

açúcar de mesa, 23

açúcar do leite, 23

açúcar sanguíneo, 24

açúcares, 2
alterações na composição e estrutura dos, 365
centros assimétricos, 23, 24
ciclização dos, 24, *25*
configuração dos, 23
da dieta, interconversões de, 355-358
interações com lectinas, 363-364
ligações com aminoácidos nas glicoproteínas, *352*
nas proteínas, 351-353
nomenclatura e estrutura dos, 23-24

açúcares ácidos, 24

açúcares aminados, 359, *360.*, 361

adaptação metabólica, 296

adenilato quinase, 163

adenilil ciclase, ativada pela proteína G, 556

adenocarcinoma gástrico, 96

adenosilcobalamina, 137

adiponectina, 292

adrenalina *See* epinefrina (adrenalina)

adrenoleucodistrofia, 92

afinidade cromatográfica, 16

agentes caotrópicos, 13, 30

agentes cromogênicos, 18

agentes fluorogênicos, 18

agrecano, estrutura do, *387*

água, 1
avaliação do estado, 322
compartimentos corporais, 307
distribuição e osmolalidade, 307
e hemostasia do sódio, 322
eliminação de, 11

metabolismo, 280, *322*
na digestão, 119
resultado do excesso, 322
solubilidade na, 23, 26

alanil-alanina, 25

alanina, 6, 10, 25, 166, 238

albinismo, 249

albumina, 14
como proteína transportadora, 36
e ácidos graxos
ativação da, 185
transporte, 36
e concentração de Ca no soro, 346
e imunoglobulina, 16
excreção urinária, 287
ligação do cobre a, 141
na fase de resposta aguda, 40

albumina de soro bovino, *7*

alcalose
rara, 333-335
respiratória
causada pela hiperventilação, 328

alcaptonúria (doença da urina preta), 250

álcool
consumo excessivo e hipoglicemia, 168
e doença hepática, 11, 397, 399
intolerância, sintomas da, 398

álcool desidrogenase, 66, 67

alcoolismo
anormalidades lipídicas no, 199
deficiência de tiamina no, 135
metabolismo do álcool, 67

aldeídos, 23, 26

aldo-hexose, 23

aldolase, 145

aldose, 23, 24

aldosterona
 controle de água e sódio renal, 322
 corticosteroides, 214-215, 216
 regulação da homeostase de Na e K pela, 317-319

alergia
 a amendoins, 512
 e fator de ativação de plaquetas, 29
 e imunoglobulinas, 40

alimentação, transporte e armazenamento de gordura em resposta a, *202*

alterações na voltagem, na neurotransmissão, 581

alucinações, deficiência de biotina, 136

alvéolos, 122

α-amanitina, 426

amendoins, alergia a, 512

amido, 23, 26
 degradação do, *27*
 digestão do, 118

amilase, 117, 118

amiloidose, 39, 573

amilose, 26, 156

aminas, 10
 biogênicas, 588
 vasoativas, 39-40

aminoterminal, 11

aminoácido C-terminal, 11, 18

aminoácido feniltiocarbamil (PTC), 18

aminoácidos, 2, 5-21

abreviações, 11
acídicos, 5, *6*, 8, 11
alifáticos, 6, 11
aromáticos, 6-7, 11, *247*
básicos, 5, *6*, 8, 11
biossíntese de, 247-248
C- terminal, 11, 18
cadeias laterais (−R), 5, 6, 8-9
α-carbono, 5, 8, 11
cetogênicos, 245-246
cíclicos, 8
classificação, 6, 8
como moléculas efetoras, *248*
como neurotransmissores, 583
como precursores de compostos essenciais, 248
configuração destro (D), 5
configuração levo (L), 5
conversão para armazenamento, 266
da dieta, *248*
de cadeia ramificada, 136, 250
 degradação de, *246*
deficiências, 36
degradação de, 239-245
desaminação de, 239, *241*
esqueletos de carbono fornecidos a partir de, 166
essenciais, *248*, 298
estado de ionização dos, 8-9
estrutura dos, *5*
exemplos, *248*
glicogênicos, 245-246
gliconeogênese a partir de, 166, *167*, 168
grupos funcionais de, *8*
grupos prostéticos, 5
hidrofílicos, 8
hidrofóbicos, 44
ligação ao tRNA, *437*
metabolismo
 doenças hereditárias de, 248-250
 e metabolismo de carboidratos e lipídios, 245
 e vias metabólicas centrais, *245*
 esqueletos de carbono, 239, 245-247
 importância da piridoxina no, 135
 nitrogênio gerado pelo, 392-393
 pesquisa por defeitos em recém-nascidos, 244
modificados, 5

não essenciais, origens dos, *247*
não proteicos, 7
N-terminal, 11, 18
pelo código genético, 6
polares, 44
polares neutros, 7
polaridade, 8
resíduos de, 11
resíduos hidrofóbicos, 6, 8, 44-45
sequência linear dos, 11
sulfurados, *6*, 8
titulação dos, 8, *10*
transportados para células epiteliais do intestino, 125
transporte ativo de, 125
20 encontrados nas proteínas, 6

aminoácidos acídicos, 5, 6, 8, 11

aminoácidos alifáticos, 6, 11

aminoácidos aromáticos, 6-7, 11, *247*

aminoacidúria, 7, 89

aminoacil-tRNA sintetases, revisão pelas, 437

aminoaçúcares, 24

aminotransferase, 166

amônia
balanço metabólico, *241*
e ciclo da ureia, 392-393
e dano cerebral, 393
encefalopatia, 243
toxicidade, 243

amplímeros, 468-469

anabolismo, 2

anafilaxia, 512

analbuminemia, 36

analisadores cinéticos, 71

analisadores de aminoácidos, 18

análise ChIP-on-chip (ChIP-chip), 486-487, *488*

análise cromossomal por microarranjo (CMA) *See* análise por microarranjo

análise por espingarda, 494, *495*

análise por microarranjo, 484-485
 tecnologia (*chip*), 486-487

análogos de nucleosídeo, como agentes antivirais, 69

andrógenos, 215-216
 excesso, 543

anéis de Kaiser-Fleischer, 141

anel da pirrolidina, 8

anel de dimetilbenzimidazol, 137

anel imidazol, 8

anel tetrapirrólico, em citocromos, 106

anemia
 cansaço causado pela, 331
 células falciformes, 436, 473
 deficiência de cobre, 106
 deficiência de ferro, 103
 e doença celíaca, 126
 encurtamento da respiração causado por, 331
 eritrócitos falciformes, 55
 hemolítica, 150, 153
 hipocrômica microcítica, 141
 macrocítica, 136
 megaloblástica, 136-137
 na mielomatose, 39
 perniciosa, 137
 sideroblástica, 136

anfotericina B, 88

angiogênese, 150

angiotensina, 11

angiotensina I, 66

angiotensina II, 66, 216, 229, *319*

anidrase carbônica I humana, 11

α-anômeros, 24, 118

β-anômeros, 24, 118

anquirina, 31

Antabuse®, 67

antecipação *See* antecipação genética

antecipação genética, bases moleculares da, *476*

antibióticos
 alvos dos, 428, 439, *441*
 e perturbação da membrana, 31
 indução da permeabilidade iônica por, 88
 polieno, 88

anticoagulação, efeito da heparina, 82

anticoagulantes, automonitoramento do paciente, 78

anticoagulantes, orais, 80

anticorpos
 ativação do sistema complemento, 520
 capacidade de diversificação, 520
 e resposta imune humoral, 519
 função relacionada a estrutura, 520
 funções efetoras dos, *521*
 glúten de trigo, 126
 terminologia, 520
 v*er também* imunoglobulinas

antígenos
 complexos de IgE, 29, 39-40
 eliminação de, 517-518
 grupo sanguíneo ABO, 374
 imunoglobulinas, ligação com, 38
 leucócito humano (HLA), 514
 reação com, 517-518

reconhecimento de, 512
resposta a, 517-518
superfície variável de, 370

antimaláricos, 153

antimicina A, inibição pela, 111, *112*

antioncogenes, *605*

antioxidantes
defesas, 2, 503-505
e vitamina C, 138
glutationa, *153*
papel, estudo dos, 235
suplementos e envelhecimento, 617

antitripsina, 41, 392

antitrombinas, 81, 82

apoceruloplasmina, 141

apolipoproteínas, 220-221

apoproteína A (apoA), 221

apoproteína E (apoE), 228

apoproteínas, 220, 221

apoptose
caspases na, 600
desregulação na formação de tumores, 602
e citocromos, 106
no desenvolvimento celular normal, 600
regulação da, *601*

aquaporinas, 320

araquidonato, 67

arginase, 244

arginina, 8, 11, 13, 18

armazenamento da gordura, regulação do, 201-203

arritmia cardíaca, 31

1-arsenato-3-fosfoglicerato, 148

arsênico, 148

artérias, entrada de lipídios na parede, 229-230

arteriosclerose, 234

artrite, 250, 302

ascorbato, antioxidante de fase aquosa, *505*

Asp (resíduo de aminoácido), 11

asparagina, 7, 13, 18

aspartato, 8, 18, *60*

aspartato aminotransferase, 136, 166

aspartato transcarbamoilase (ATCase), 68

Aspirina® *See* ácido acetilsalicílico

astrócitos, 570, 572

ataque cardíaco
 e hipercolesterolemia familiar, 228, 229
 e HRT, 545

ataxia, deficiência de tiamina, 135

ataxia, telangiectasia, 600

aterogênese, 226-232
 disfunção endotelial, iniciada pela, 228-229
 e inflamação, 229, 231
 e leucotrienos, 231-232
 e prostaglandinas, 231-232
 entrada de lipídios na parede arterial, 229-230
 papel das citocinas na, *231*
 papel dos fatores de crescimento na, *231*
 principais componentes da, 227-228
 processo de, *230*

aterosclerose, 2
genética da, 233
placas, 232
reação inflamatória de baixa intensidade na, 229
relação com obesidade e diabetes, *283*

ativador de plasminogênio
tipo tecidual (tPA), 83, 84
tipo urinário (uPA), 83, 84

ativador do plasminogênio tecidual, 83, 84

átomo de α-carbono, 5, 8

atopia, 40

ATPase
ATP7B, 141
bombas iônicas, 91-93
fator de acoplamento (F-ATPase), 92
Na+/K+
e água, 308, 309
estrutura da subunidade α, *310*
função catalítica, *309*
nos rins, 313
papel na captação de glicose, 93-95
regulação da atividade, 313

ATPase mitocondrial do tecido cardíaco, 13

atractilosídeo, 112

atraso no desenvolvimento, 90

atropina, 70

autoativação, 125

autocatálise, 125

autodigestão, 122

autofagia, 239

autofagossomas, 239

autoimunidade, e educação tímica, 521, 523

autorradiografia, 462, 463

B

baço
 na doença de Tangier, 224
 renovação (*turnover*) de células vermelhas no, 29

bactérias, 14
 cáries dentárias, 148
 e vitamina B_{12}, 137
 resistentes a antibióticos, 468
 sítios de ligação para, 375
 uso na clonagem celular, 467-468, *469*

bacteriorodopsina, 31

bainha de mielina, 29

baixa estatura, deficiência de GH e, 547

balanço acidobase
 componentes respiratórios e metabólicos do, 327
 regulação do, 325-335
 sistemas de tamponamento corporal, 325-327

barbituratos, 36

barreira de filtração glomerular, *313*

barreira hemato-CSF, 570

barreira hematoencefálica, 90, 569-570

base de Schiff, 283
 ciclização de açúcares, 24

bases, conjugadas, 9

benzodiazepinos, 95

beribéri, deficiência de tiamina na, 135, 176

bicarbonato
 geração, 331
 manipulado pelos rins, 331-335

reabsorção, 331
secreção ácida, *95*
tampão, 326-327

1,3-bifosfoglicerato (1,3-BPG), 143

2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG), 49, 143
degradação de, *150*
efeito do, 51-52
ligação à hemoglobina desoxigenada, *51*
síntese de, 149-150

bile
colesterol na, 212
excreção de cobre, 141
secreção pela vesícula biliar, 122
síntese e secreção, 213

bilirrubina, 36, 37
e hepatócitos, 394
excesso, na icterícia, 393-394
metabolismo dos, 393-394

biomarcadores
de estado nutricional, 301
de estresse oxidante, 615
definição, 496

biomembranas
estrutura das, 29-31
saturabilidade e especificidade de, 89
sistemas de transporte das, *87* *See also* membranas biológicas; *See also* membranas

biomoléculas
danos às biomoléculas, 502, *504*
mudanças químicas dependentes de envelhecimento nas, *611*

biópsia renal, 35

bioquímica
mudanças durante o envelhecimento, *609*
inter-relações entre as vias, *3*
médica, 1
no contexto clínico, 1, 3-4

biotina, carboxilação, 136

bloqueador malonato, 181

bloqueio, 90

bloqueio de voltagem, 90

boca, deficiência de riboflavina, 135

bomba de ATPase, 91-93

bomba de sódio-potássio, *309*

bombas de próton
 no estômago
 inibição das, 96

bombas íônicas, 91-93

escova de garrafa, 387

botulismo, 575

brometo de cianogênio, 18

C

cabelo, alteração na deficiência de cobre, 141

cadeias laterais (−R), aminoácidos, 5, 6, 8-9

cadeias peptídicas, 5
 carga e polaridade das, 11
 dobramento das, 13
 interações entre, 13-14

cadeias polipeptídicas, 8, *12*, 17, 38

cádmio, 141

cafeína, 161

cálcio
 absorção, 343
 (Ca^{2+}) ionizado, 340
 como mineral principal, 298-299
 concentrações no soro, 343
 excreção, 343
 hemostasia, 340-343
 metabolismo, 337-349
 distúrbios de, 343-347
 mobilização
 requerimento para contração muscular, 258-259

calcitonina, inibição da reabsorção óssea, 343

calmodulina, 558-559

camundongo, longevidade do, 617, *618*

canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VDCC), 93, 94

canais iônicos, 574

canais, transporte através de, 90-91

canal aquoso de aquaporina, 88

canalopatias, 575

câncer, 2, 603-607 *See also* carcinomas, tumores
classificação, 603
cólon, 136, 607
colorretal, 604
e ciclo celular, *601*
e estilo de vida, 305
e proteína quinase C, 563
e suplementação de vitaminas, 139
fígado, 392
mama, 545
marcadores de, 365
melanomas *See* melanomas
metástases *See* metástases
mutações no, 603
pancreático, 402
proteossoma, inibindo, 444
pulmão, 139
remoção estomacal em, 117
retinoblastoma, 606-607
síndromes hereditárias, *606*

câncer colorretal, desenvolvimento de mutações subjacentes no, 604

câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC), 604

câncer de cólon, 136, 607

câncer de mama *See* câncer, *See also* mama

capilares, 75

carbamoil fosfato, síntese, *242*, 243

carboidratos, 1, 2, 23-26
absorção de, 118-121
armazenamento e síntese, no fígado e no músculo, 155-170
complexos, 115, 351-365
definição, 23
dieta pobre em carboidrato, redução de peso, 304-305
digestão de, 118-121, 122
e interações célula-célula, 359
função dos, nas glicoproteínas, *352*
hidrofílicos, 23
metabolismo de
e metabolismo de aminoácidos, 245
no fígado, 391

na comida, 115, 297
reservas energéticas, distribuição tecidual, *155*
substâncias do grupo sanguíneo como, 374-376

carbonil, resíduos carbonil, 11-12

carbono
esqueletos, 166
metabolismo de aminoácidos, 239, 245-247
hidrocarboneto de 30 carbonos, 208
ligações carbono-carbono, clivagem, 215

carboxilação
e biotina, 136
e tiamina, 134-135

carboximetilcelulose, 16

carboximetilcisteína, 18

carboxipeptídios, 125

carcinoma hepatocelular, 11

carcinomas, 363, 419, 573, 601

cardiolipina, 29

cardiomiopatia, 106

cardiomiopatia de Brody, 92

cáries dentárias, e glicólise, 148

cariotipagem, 483-485

carnitina, metabolismo defeituoso, 191

β-caroteno, 130, 139

carotenoides, 130

carregadores de íons móveis, *88*

cartilagem, *612*

cartilagem costal, alterações com a idade da, *612*

cascata da coagulação, 130

cascata Ras-MAPK, 596

caspases, na apoptose, 600

catabolismo, 2, 188
 aminoácidos, *247*
 corpos cetônicos, *190*
 de nucleotídios de pirimidina, 411
 em tecidos periféricos, *190*
 peroxissomal, de ácidos graxos, 188

catalase, e complexos ferro-enxofre, 104

catálise, rotatória, 107-108

catarata, 110, 284

catecolaminas, 585-587, 589

caveolar, 31

cefalina, 29

cegueira, 110

células
 crescimento de, 2
 eucariotas, 29
 hematopoiéticas, 596-597
 migração de, 230-231
 proliferação de, 230-231

células apresentadoras de antígeno (APCs), 516-517

células brancas *See* leucócitos

células do músculo liso (SMC), 262

células endoteliais, 75, 76

células eucarióticas, 29
 transportadores nas, *91*

células musculares lisas vasculares (VSMC), 227

células parietais, 121

células parietais gástricas, secreção ácida das, *95*

células tumorais, glicólise nas, 150

células vermelhas sanguíneas (RBCs), 1, 143 *See also* eritrócitos
função da via da pentose fosfato nas, 152-153
metabolismo de glicose, 148
regulação da glicólise nas, *149*
utilização da glicose pelas, 144

celulose, 23, 26, 27
acetato, 16
unidades dissacarídicas da, *27*

centrifugação, 14

cérebro
dano, e amônia, 393
e nervo periférico, 569-570
parênquima do SNC, 570

cerebrosidoses, 372

ceruloplasmina, 41, 141
atividade ferroxidase plasmática da, *37*
deficiência, 392
na doença de Wilson, 37, 38, 392

cetoacidose
afeta o balanço de potássio, 285
diabética, 281, 282, *283*

cetoacidose diabética, 281, 282, *283*
tratamento de emergência, 288

cetoacidúria, 250

cetogênese
defeituosa, 189, 191
no fígado, 189-192
vias a partir de acetil-CoA, 189-192

α-cetoglutarato, 180-181
relação com glutamato e glutamina, *240*

ceto-hexose, 23

cetonúria, e programas de perda de peso, 191

chaperonas, 20

choque anafilático, 29

cianeto, 111-112, 113

ciclinas, 597

ciclo alimentar rápido, 2, 274-278

ciclo celular, 593-594
 análise da progressão e células apoptóticas, 602
 e câncer, *601*
 em eucariotos, 416-419
 estágios do, *417*
 fases, *594*
 ponto de restrição, 597-598
 regulação do, 597-599
 regulação dos fatores de crescimento do, 599
 subversão do, 606

ciclo da ureia
 e amônia, 392-393
 e ciclo do TCA, *244*
 e metabolismo central, 241-245
 enzimas do, *242*
 fontes de nitrogênio, 240-241
 na mitocôndria e no citosol, 243
 regulação do, 244-245
 remoção do nitrogênio, 392-393

ciclo de Cori, *276*, 277

ciclo de Krebs *See also* ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)

ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo do TCA), 2, 173-184
 defeitos metabólicos no, raros, 174-175
 deficiências no metabolismo do piruvato no, 180
 e átomos de nitrogênio, 240
 e ciclo da ureia, 244
 enzimas do, 177-182
 funções do, 173-175

interconversão de combustíveis e metabólitos no, 173
intermediários do, *178*
localização do, 174
natureza anfibólica do, *174*
produção de energia a partir do, 182-183
reações do, 177-182
regulação do, 183

ciclo glicose-alanina, 238, *276*

ciclo menstrual, significado do nível de progesterona, 544

ciclo-oxigenase, 67, 76, 77

ciência da nutrição
definições, 294-295
e índice de massa corporal (BMI), 300
recomendações, 303-304

cinética de Michaelis-Menten, 69

cininogênio de alto peso molecular (HMWK), 79

circulação, êntero-hepática, 213

cirrose, 38
e excesso de Cu, 141
selênio, excesso, 141
sistemas de transporte, 92

cistamina, 89

cisteína, 8, 13, 18-19
e glutationa, 11

cistina, 8, 18, 89

cistinose, 89

cistinosina, 89

citocinas
anti-inflamatórias, 510-511
aterogênese, *231*
classificação, 511
e óxido nítrico endotelial, 76
famílias de, 511

pró-inflamatórias, 293
sinalização de receptores, 596-597

citocromo c, 101, 106
redutase, 105

citocromo P-450
controle da esteroidogênese, 215
e metabolismo de drogas, 395
polimorfismo genético, 396

citocromos, 106
e complexos ferro-enxofre, 104
oxidase, 140
variação nas estruturas heme, *106*

citoesqueleto, 31

citoglobina (Cygb), 52-53

citomegalovírus (CMV), 69

citosol, 106, 243

citrato
clivagem de, 199
ligação de, 195
sintase, 177, *178*, 179

citrulina, 7

clara de ovo, como antídoto para metais pesados, 68

clivagem proteolítica, 14

cloreto, como principal mineral, 298-299

cloreto de dansil, 18

Clostridium botulinum, 575

CNS *See* sistema nervoso central (CNS)

coagulação, 78-83

coagulação intravascular disseminada (DIC), 81

coágulo, 68

cobalamina, 139

cobre
como elemento traço, 140
deficiência, 141
em neonatos, 106
deposição no fígado, 37
e enzimas oxigenases, 140-141
e tratamento de zinco, 92
excesso e cirrose, 141

cobre, na doença de Wilson, 37, 38

código genético
degeneração do, 435-436
mutação do, 436

coeficiente de Hill, 47, 69

coenzimas, 1
A (CoA), 136, 206-207
e vitaminas hidrossolúveis, 134
papel das, 62
Q_{10}, 102, 104, 106
rara deficiência de, 103
redox, 100
estrutura do, *102*
reduzida, e síntese de ATP, 100-101
vitaminas como, 62, 129

cofator tetra-hidrobiopterina, 590

cofatores, 1

colágenos, 12
alterações químicas relacionadas à idade nos, *613*
arranjo quaternário escalonado das moléculas (*quarter-staggered array of molecules*), *378*
biossíntese e processamento do, *380*
classificação e distribuição do, *378*
como proteínas principais na MEC, 377
e vitamina C, 138
estrutura dos
tripla hélice, 377
estrutura tridimensional, *378*

formação fibrilar (fibrilar), 378
formação intercruzada, *381*
na matriz óssea, 337
não fibrilar, 378-381
papel nos vasos sanguíneos, 76
pró-colágenos, 380-381
síntese, 138
subendotelial, 75
tipos de, 377-381
tipo I, 378
tipo IV, 378

colecalciferol, 216 *See also* vitamina D3

colecistoquinina, 122

cólera, toxina, 375

colestase intra-hepática progressiva, 92

colesteril esterase, 122

colesterol
absorção de, 206
absorção intestinal, 206
biossíntese de, 206-210
como esteroide, 26
como precursor de hormônios esteroides, 213-214
controle por estatinas, 207-211
defeito na biossíntese, 209
diminuição no plasma, 214
e fluidez da membrana, 206
e fosfolipídios, *28*, 29
estrutura do, 206
excreção nas fezes, 213-214
inibição do transportador, 235
livre, e esterificado, 206
metabolismo, e ácidos biliares, 394
na manteiga, 28
nos remendos das membranas, 31
regulação da concentração intracelular, 210-211, 221-222
remoção, 224
síntese e captação intracelular, 223-224
síntese e vias relacionadas, *205*
transporte reverso de, *225*
via do transporte reverso, 224

colestiramina, diminuição do colesterol plasmático pela, 214

colina
 e ácido fólico, 136
 e envenenamento por inseticida, 70
 e fosfato, 28

coloração por prata, 17

colostro, 39

combustível, troca, 1

comida
 conteúdo energético da, 97
 macromoléculas na, 115

complexo conversor de pró-trombina, 33

complexo da vitamina B, 133-136
 ação como coenzimas, 62, 133-134
 estrutura, fontes e doenças da deficiência do, *134*

complexo enzima-substrato (ES), 63, 67

complexo golgiense, 14
 processamento do VLDL, 201
 síntese de oligossacarídeos no, 362

complexo hemoglobina-haptoglobina, 37

complexo I (NADH-Q redutase ou NADH desidrogenase), 103, 111

complexo III (citocromo c redutase, ubiquinona-citocromo c redutase, QH2-citocromo c redutase), 111

complexo IV (citocromo c oxidase ou citocromo oxidase), 107

complexo principal de histocompatibilidade (MHC), 514-515
 estrutura do HLA de classes I e II, 514, *515*
 organização genética do, *515*

complexo sucrase-isomaltase, 121

complexo trombina-trombomodulina, 82

complexos ferro-enxofre, em reações redox, 104

complexos fosforil-enzima, 70

compostos anfipáticos, 31

compostos trifosfatados, 69

concentração de cistatina C, e GFR, 316

concentração de gradientes, 93

concentração micelar crítica, 122

concentrações de tampões, 1

concentrações íônicas, 1

concreto reforçado, 386-387

conexina, 91

confusão, deficiência de tiamina, 135

conjugase, 136

constante catalítica (K_{cat}), 63

constante de dissociação (Ka), 10
 logaritmo negativo da (p*K*a), 8-10

constante de Michaelis (K_m), 64

constipação, deficiência de tiamina, 135

consumo adequado (AI), 296

contagem sanguínea completa (CBC), 55, *56*

controle respiratório
 definição, 109
 e regulação por retroalimentação (*feedback*), 113
 e relação P:O, 108-109

convulsão, transporte defectivo de glicose, 90

convulsões, refratárias, 13

coordenação visual, perda na deficiência de tiamina, 135

CoQ_{10}, 102, 103, 104

corante Coomassie blue, 17

corantes, fluorescentes, 18

córnea
anéis de Kaiser-Fleischer, 141
na doença de Tangier, 224
proteoglicanas na, 388

corpos cetônicos
catabolismo nos tecidos periféricos, *190*
concentrações plasmáticas de, *190*
entrada no cérebro, 90

corpos de Heinz, 153

corticosteroides, 76, 214-216

cortisol
biossíntese de, 536
distúrbios clínicos de secreção, 537-540
e crescimento/regeneração tecidual, 536
e glicogenólise, 158
e metabolismo, 536
hipossecreção, 537
mobilização lipídica, 191

creatinina, 7
alta concentração, na falência renal, 319
ensaio de, 261
níveis no soro de, 316

criança, macrossômica, de mãe diabética, 163

crises vaso-oclusivas das células falciformes, tratamento analgésico das, 55

cristalino
deslocamento do, 13
mudanças com a idade nas proteínas, *612*

cristalografia de raio X, 13, 17, 20

cromatografia
afinidade, 16

gel filtração15-16
gradiente, 16
líquida de alta eficiência (HPLC) *See* cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)
mobilidade das proteínas durante, 55

cromatografia de permeação em gel, 15, 16

cromatografia de troca iônica, 15, 16, 18

cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GCMS), quantificação de esteroides através da, 214

cromatografia isocrática, 16

cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), 16

cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa *em tandem* com ionização por *eletrospray* (ESI-MS/MS), 19-20
de fase reversa, 18
e ácido fólico, 136
e deficiência de tiamina, 135
e hemoglobinas, *54*

cromatografia líquida e espectrometria de massa, 493-494

cromo, 140

cromóforos, 70

cromossomos
compactação do DNA nos, 416
empacotamento dos, *417*
telômeros, 416

CSF *See* líquido cerebroespinhal

cuproenzimas, 106

CYP3A, exploração terapêutica da inibição, 395

D

D-ceto-hexoses, 23

debate manteiga *versus* margarina, 28

debate margarina *versus* manteiga, 28

defeitos de nascimento, padrões complexos de, 465

deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD), 188

deficiência de carboxilase, 136

deficiência de desidrogenase da L-3 hidroxiacil-CoA de cadeia longa (LCHAD), 192

deficiência de GPIb-IX, 77

deficiência de GPIIb-IIIa, 77

deficiência de sulfito oxidase, 13

deficiência na cadeia longa, L-3-hidroxi-acil-CoA desidrogenase (LCHAD), 192

degeneração macular relacionada à idade (AMD), 432

degradação de Edman, 17, 18-19

degranulação eosinofílica, 39

demência, e deficiência de niacina, 135

depressão
- como doença de neurotransmissores de amina, 585
- deficiência de biotina, 136
- deficiência de tiamina, 135
- selênio, excesso, 141

derivados de feniltio-hidantoína (PTH), 18

derivados de transmetil gluconato, 209

dermatan sulfato, 384-385

dermatite, 135

causada por deficiência de niacina, 135
deficiência de biotina, 136

desacopladores, 109, *110*

desaminação oxidante, 239

descolamento do cristalino, homocisteinúria, 13

desidratação, 322
a partir da poliúria, 89
diminuição de GFR, 322
diminuição do fluxo sanguíneo renal, 322
e ingestão de líquidos, 322
na diarreia, 117

desidratase, retirada de água pela, 239

deslocamento do corte (*nick translation*), 463

desmopressina, 77

desmosina, *382*

desnaturantes, 13

desnutrição, 1, 301-303
e deficiência de múltiplos nutrientes, 129
e pancreatite, 122
proteína, 245
proteína-caloria, *302*, 302
síndrome da realimentação, 302-303
tratamento inapropriado, 302-303

desordens acidobase
causas clínicas das, *334*
classificação das, 327
de origem respiratória e metabólica, *334*

desordens inflamatórias intestinais, 41

desoxiaçúcares, 24

5′-desoxiadenosil cobalamina, 137

desoxinucleotídios, formação dos, 409-411

2-desoxirribose, *26*

desperdício de nitrogênio, 1

despolarização, 581

dessaturação, de ácidos graxos, 199-200

dextran, 16

α dextrina-limite, 118, 121

D-frutose, 24

D-galactose, *24*

D-glicose, 24, 89

diabetes, 1, 2
administração do, 305
anormalidades na via de transporte de combustível, 225
avaliação periódica do, 287
classificação do, *279*
complicações do, 283-284
complicações vasculares do, 279
controle da glicemia no, 288
diagnóstico, 284-287
e comprometimento da função renal, 315
e doença cardiovascular, 282
e hiperglicemia, 279
e hipoglicemia, 281
familiar com idade de diagnóstico precoce (MODY), 280
mal controlada, 281
metabolismo no, 280-282
modulação da atividade do transportador no, 94
monitoramento do, 70
prevenção, 287-288
sobrecarga de ferro como fator de risco, 500
tipo, 1, 279-280
tratamento, 288
tipo, 2, 41, 280
e produção de ATP, 114
e obesidade, 111, 281, 302
e resistência à insulina, 269
tratamento, 288
tratamento, 287-289

diabetes *mellitus*
avaliação do, 284-287
desenvolvimento de complicações, *285*
e dislipidemia, 228
e HLPC, *54*
e nutrição, 305
formas de, 279
metabolismo no, 279, *282*
monitoramento do controle da glicemia no, 288

diacilglicerídeo, 28

diacilglicerol (DAG), 118
ativação de PKC, 561
precursor de fosfolipídios, 367

1,2-diacilglicerol-3-fosfato, 28

diálise, 15

diarreia, 117, 135

didesoxinucleosídios fosfatados (dNTPs), 470

didesoxinucleotídios (ddNTPs), no sequenciamento de DNA, 470, *478*

dieta, 1
alimentação balanceada, 303-304
cetogênica, 90
debate manteiga-margarina, 28
e câncer, 305
e prevenção cardiovascular, 305
e prevenção de doença coronária, 305
frutas e vegetais, 140
na saúde e na doença, 303-305
pirâmide alimentar, *304*
pobre em carboidrato, 304-305
pobre em colesterol, 305
pobre em gordura, 305
recomendações atuais, 303-304

dietilaminoetil (DEAE) celulose, 16

difosfato de adenosina (ADP), 77

difosfato de guanosina (GDP), 158

difosfato de uridina (UDP), 156, 157

difusão
 através da bicamada fosfolipídica, 87-88
 cinética do transporte na, *89*

difusão facilitada, cinética de transporte da, *89*

difusão simples, cinética de transporte por, *89*

digestão, 115-126
 bases mecânicas e anatômicas da, 115-116
 de carboidratos, 118-121, 122
 de lipídios, 121-124
 de polímeros alimentares, *119*
 de proteínas, 124-126, 238
 definição115
 emulsificação da gordura antes da, 121-122
 princípios gerais da, 117

di-hidrolipoil desidrogenase, 176

di-hidrolipoil transacetilase, 176

di-hidropiridina (DHP), 95

di-hidroxiacetona
 e carboidratos, 23
 fosfato, 145

1α,25-di-hidroxicolecalciferol (1,25(OH)2D_3), 342

1,25-di-hidroxicolecalciferol (1,25$(OH)_2D_3$), 343

di-hidroxifenilalanina, 249, 502

di-isopropilfluorofosfato, 65

diltiazem, 95

dímeros, 118

dímeros covalentes de proteínas, 8, 13

dimetilalil pirofosfato, 209

dinitrofenol (DNP), 110

2,4-dinitrofenol (DNP), 109, 110

dióxido de carbono (CO_2), 2
 efeitos, 50-51
 pressão parcial (pCO_2)
 na respiração, *329*
 transportado por eritrócitos, 330

dipeptídeos, estrutura dos, 11

dipiridamol, 77

disbetalipoproteinemia familiar, 228

disfagia, 575

dislipidemia familiar, 226

dislipidemias, 2, 225-226
 administração clínica de, 234
 classificação fenotípica de, *226*
 diagnóstico laboratorial de, *234*
 e diabetes *mellitus*, 228
 e xantelasma, 235
 formas genéticas mais importantes de, *226*, 228

dispneia, causada por anemia, 331

dissacaridases, 118
 indutibilidade das, 118-119

dissacarídios
 clivagem dos, 118
 estrutura dos, 27

dissacarídios, 118

dissulfiram, 67

distrofia muscular de Duchenne, 256, 474

distrofias musculares, 256, 383

distrofina, 256

distúrbios de sangramento
 congênitos, 77

e vitamina K, 132-133
excesso, causas de, *75*
relacionados às plaquetas, 76-77

ditiotreitol, 8

diuréticos
para tratamento de edema, 320
para tratamento de falência cardíaca, 320
para tratamento de hipertensão, 320

D-manose, *24*

DNA *See* ácido desoxirribonucleico (DNA)

doadores, 13

doença aguda da montanha (AMS), 52

doença autoimune, 521, 523

doença cardiovascular
e diabetes, 282
e hiper-homocisteinemia, 136
e hipertensão, 282
e HRT, 545
e obesidade, 282
e proteína C reativa, 41
e síndrome metabólica, 282
e suplementação de vitaminas, 139
risco de *See* risco cardiovascular

doença celíaca, 126

doença colestática, 400

doença da célula falciforme (SCD), 53-55

doença da célula I, 364

doença da montanha, aguda (AMS), 52

doença da urina em xarope de bordo (MSUD), 250

doença da urina preta, 250

doença da vaca louca, 20

doença de Alzheimer, 20, 615

doença de Charcot-Marie-Tooth, 91

doença de Creutzfeldt-Jakob, 20

doença de Crohn, 137

doença de Cushing omental, 540

doença de Fabry, 374

doença de Gaucher, modelo de terapia de reposição enzimática, 373

doença de Hartnup, 89, 125

doença de Keshan, 141

doença de McArdle, 161

doença de Menkes, 92

doença de Paget, 347

doença de Parkinson, 20, 243

doença de Stargardt, 92

doença de Tangier, 92, 224

doença de von Gierke, 158

doença de von Willebrand, 76, 77

doença de Wilson, 38, 92
 ceruloplasmina, deficiência, 392
 cobre na, 37

doença hepatocelular, 400

doença metabólica óssea, *See* doença óssea, metabólica

doença óssea, metabólica, 347-348

doença por lesão mínima, 312

doença renal, e nutrição/desnutrição, 305

doença tromboembólica, e HRT, 545

doenças
avaliação do risco utilizando SNPs, 486
componente genético hereditário das, 482, *483*
hereditárias, 248-250

doenças associadas aos transportadores ABC, 92-93

doenças de armazenamento lisossomal, 372-373

doenças de príon, 20

doenças hepáticas
características clínicas das, *390*
deficiência de α1-antitripsina, 392
e álcool, 11, 397, 399
genômica das, 399
graves, *390*
obstrutivas, 402
sintomas das, 38

doenças neurodegenerativas, 20

domínios, 13

DOPA ver di-hidroxifenilalanina

dopamina
como neurotransmissor, 586
desordens no metabolismo, 589
inibidor de prolactina, 547

drogas, 1
antiplaquetárias, 77-78
antitrombóticas, 73, 133
antituberculose, 135
antivirais, 69
citotóxicas, 88, 519
diuréticas, 320
estatinas, 207-211
grupo dicumarina, 133
hepatotoxicidade das, 396-397
inibição dos transportadores pelas, 95
metabolismo das, 395-398
papel do citocromo P450, 395, 396

polaridade, 395
reações redox, 153
sulfonilureias, 288

drogas anti-inflamatórias, 564

drogas anti-inflamatórias não esteroidais (NSAIDs), 67

drogas antiplaquetárias, 77-78

duodeno, 122

E

edema
 e fator de ativação de plaquetas, 29
 e hipóxia, 52
 e perda proteica, 312
 na síndrome nefrótica, 35
 pulmonar, 35
 tratamento diurético para, 320

educação tímica, 512
 e autoimunidade, 521, 523

efeito Bohr, 49-50, 54-55

efeito heterotrópico, 68

efetores alostéricos e proteínas, 49

eicosanoides, 564-566
 síntese, *565*

eixo hipotálamo-pituitária-gonadal, 540-544
 controle de, *542*

eixo hipotálamo-pituitária-tireoide, 532-535

elastase, 125
 atividade enzimática, 60, 65
 sítios de ligação do substrato da, *60*

elastina, 381
 ligação cruzada de desmosina na, *382*

elementos traço, 2, 140-141

eletroforese
 mobilidade de proteínas durante, 55
 soro, 39, 41

eletroforese bidimensional, 17, 18-20, 491-492

eletroforese de campo pulsado (PFGE), 467

eletroforese do soro, 39, 41

eletroforese em gel
bidimensional (2DE), 17, 18-19, 491-492
capilar, *478*
de campo pulsado (PFGE), 467
de gradiente desnaturante (DGGE), 475-476, *477*

eletroforese em gel bidimensional diferencial (DIGE), 18

eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), 16-17, 19, 21

eletrólitos
avaliação do estado, 322
e água, 309
na digestão, 115

elétrons, lançadeiras, 104

eliptocitose, 31

embolismo, pulmonar, 84

êmese, prolongado, 116-117

enantiômeros, 5, 6

encefalomiopatia mitocondrial, 113

encefalopatia espongiforme, 20

encefalopatias, amônia nas, 243

encefalopatias espongiformes transmissíveis, 20

endocrinologia
bioquímica, 525-548
imprinting na, 527

endopeptidases, 124

endoproteases, 18

endossomas, 92

endotélio
disfuncional, 227-229

inibição arterial da coagulação, 227
repelimento de células/inibição da coagulação sanguínea, 227
superfície antitrombótica, 75

energia
conservação através do acoplamento com ATP, 99
fontes de, 23
gasto
durante atividade física, *294*
liberação, 2
livre, 98-99
requerimentos por idade e sexo, *294*
transdução de, *101*

energia livre de Gibbs (?G), 98-99

engenharia tecidual, e matriz extracelular (MEC), 388

enolase, inibição pelo fluoreto, 148

ensaio de Fehling, 26

ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA), *452*

ensaio imunoenzimático (ELISA), *531*

ensaios cinéticos, 70-71

ensaios *in vitro*, 59

enterócitos
e absorção de lipídios, *123*
e digestão, 115, 116, 118
e síntese do triacilglicerol, 124
e vitaminas, 130

enteropeptidase, intestinal, 68

enteropeptidases, 117, 125

envelhecimento, 2, 609-618
biomarcadores do, 615
definição de, 609
do sistema circulatório, 615
dos sistemas complexos, 609
modelos genéticos do, 615-617
modelos matemáticos do, 610-611

teoria do radical livre (FRTA), 612-614
teorias biológicas do, 611-612
teorias do, 611-615
teorias mitocondriais do, 614-615
teorias químicas do, 611-612

envenenamento por metanol, tratamento com etanol, 66

enzima conversora de angiotensina (ECA), 66

enzimas
ácidos ribonucleicos atuando como, 430
alostéricas, *69*
atividade
definição de, 60-62
regulação de, 68-70
cinética das, 62-64
classificação das, *61*
coagulação sanguínea, 68
CYP, 216
deiodinase, 534-535
dependentes de cálcio/magnésio, 33
digestórias, 68, 117-118
ativação proteolítica das, 68
e ciclo da ureia, *242*
e estrutura de oligossacarídios, 354
e metabolismo lipoproteico, *222*
e proteínas de transferência, 222
especificidade das, 60
estado R (relaxado), 69, 70
estado T (tenso) das, 69, 70
estereoespecificidade das, 179
expressão em resposta à ingestão de alimentos, 200
fosforilação, papel regulatório da, *273*
glicolíticas, 2
hepáticas, baixa especificidade do substrato das, 395
inibição das, 65-66, 71
competitiva, 66
não competitiva, 67
por drogas e venenos, 67-68
por estatinas, 207-211
intestinais, 117
isoenzimas, *61*
isostéricas, 68
lipase *See* lipases

lisossomais, *364*
mecanismo de ação, 64-65
multienzimas, 408
multiméricas, 68
nomenclatura das, 61-62
pancreáticas, 60, 122
polimerase, 470
quantificação da atividade em amostras clínicas, 64
quantificação das atividades, 129
regulação heterotrópica, 68-69
regulação homotrópica, *69*
regulação pelos hormônios, 272
regulatórias, características das, 149
sulfidril, 68
superfamília (PTK) de*563*
taxa limite
regulação alostérica da, 68-69
uso diagnóstico, *61*

epidermólise bulbosa, 383

epigenética, 455

epilepsia, neonatal, 588

epimerases, 152

epinefrina (adrenalina), 2
ação da, 271
como neurotransmissor, 585-586
e vitamina C, 138
mobilização de glicogênio hepático, 161-163
mobilização lipídica, 191
uso na alergia, 512

epitélio
digestão proteica, 124
estômago e intestinos revestidos pelo, 116

equação de Henderson-Hasselbalch, 9-10, 327

equação de Lineweaver-Burk, 89

equação de Michaelis-Menten, 62-64, 71, 89

equações de Gompertz, 610

ergosterol, 88

eritrócitos, 143-144
atividade de transcetolase, 135
e ácido fólico, 136
e equilíbrio acidobase, 325
e transporte de CO_2, 330
ensaio de transporte usando, 90
esquema de formação dos, *34*
falciformização, 55
funções dos, 33
hemoglobina e óxido nítrico, 52
na doença de célula falciforme, 53-54

eritropoiese, 33

eritropoietina, recombinante, 467-468

Escherichia coli, bioquímica das DNA polimerases em, 419

esclerose lateral amiotrófica, 20

esclerose múltipla, 573

escorbuto, 12, 76
e deficiência de vitamina C, 138

esferocitose, 31

esfingolipídios, 29, 31, 370-372
e piridoxina, 135

esfingomielina, 29, 135, 371

esfingosina, 135
estrutura e biossíntese da, 370-371

espaço sináptico (fenda), 582-583

espasmo epiléptico, 20

espécies reativas de nitrogênio *See* nitrogênio, *See also* espécies reativas (RNS)

espécies reativas de oxigênio *See* oxigênio, espécies reativas (ROS)

especificidade das reações, enzimas, 60

especificidade do substrato
enzimas, 60, 395
proteases pancreáticas, 126

espectrina, 31

espectrofotometria, 7

espectrometria de massa, 14, 20, 21, 492-493
e cromatografia líquida, 493-494
separação de esteroides urinários por, *217*
tandem, 492, *494*

espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (ESI MS), 19-20

espectrometria de massa *em tandem* (MS/MS), *19*

espectroscopia por ressonância magnética nuclear (NMR), 13, 20, 496

espermatogênese
e zinco, 140
influência do FSH e do LH na, 541

espinha bífida, 136

esplenomegalia, 141

esqualeno
biossíntese de, *209*
formação do anel pelo, 208

estado absortivo (pós-prandial), 274

estado alimentado (absortivo), 274

estado de jejum (pós-absortivo), 2, 189-191, 274-275, *276*
durante a noite (*overnight)* (pós-absortivo), *276*
e fígado, 274-275
metabolismo durante, *276*
prolongado, 277-278

estado nutricional
fatores determinantes para, 291
marcadores bioquímicos do, 301
proteínas plasmáticas como marcadores do, 301

estado pós-absortivo (jejum), 189-191

estado pós-prandial (absortivo, alimentado), 274

estatinas
 controle de colesterol, 207-211
 inibição da HMG-CoA redutase, 234

estatura, baixa, 547

esteatorreia, 122

éster serina-di-isopropil fosfato, 65

esterases, 70

estereoisômeros, 5, 23

estereoquímica, 5-6
 da redução do NAD+, *179*

esteroides
 biossíntese dos, *537*
 deficiência na 21-hidroxilase, 214
 e lipídios, 26
 quantificação dos, através da cromatografia com espectrometria de massa (GCMS), 214
 urinários, separação dos, *217*
 vias biossintéticas, *215*

esteroidogênese, 138
 controle da, 215

estilo de vida, 1

estômago
 bomba de próton no, 96
 células G no, 121
 conteúdo ácido do, 116
 digestão proteica no, 125
 lúmen do, 116
 remoção do, em caso de câncer, 117
 revestimento do, 116

estradiol, síntese, 543-544

estresse oxidante (OxS), 2, 283
 e espécies reativas de oxigênio, 500-501
 aplicação médica, 501

estresse
e glicogenólise, 278
e gliconeogênese, 278
e hormônios anti-insulina, 278
e resistência à insulina, 278-279
e testes laboratoriais, 279
metabolismo durante, *278*
oxidante, 283-284

estrógenos, 216

estrutura β-pregueada, *13*

estruturas da neuroglia, 572

estruturas lamelares, 29

etanol, utilização no envenenamento por metanol, 66

etanolamina, 28

eucariotos
ciclo celular em, 416-419
e procariotos, 425-426
replicação do DNA, 418-419

exalação, 1

excitotoxicidade, 583-584

exercício
e AMPK, 100, 293-294
e biogênese mitocondrial, 100

exocitose, 124

expectativa de vida, modelos genéticos de aumento da, 615-617

F

FACITs *See* colágenos

FAD *See* flavina adenina dinucleotídeo (FAD)

fagocitose, 29, 39
 promoção, por neutrófilos e macrófagos, 512

falência cardíaca, 1, 320, 320, 559

falência da suprarrenal, 537

falência hepática, e paracetamol, 398

falência hipotalâmica, 537

falência renal
 alta concentração de creatina, 319
 alta concentração de ureia no soro, 319
 diminuição da produção de urina, 319
 e perda de peso, 301

família do gene *Bcl-2*, 600

farmacogenômica, 1, 398

farnesil pirofosfato, 207-208

fator de ativação de plaquetas (PAF), *28*, 75
 e hipersensibilidade, 29

fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)
 signaling element scaffold, *595*
 sinalização do receptor, *595*,, 596

fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), 545-546

fator de necrose tumoral (TNF), família, 511

fator de necrose tumoral α (TNF-α), 201

fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), 52, 75, 76, 227

fator de von Willebrand (vWF), 75

fator intrínseco (IF), 121, 139

fator VIII, 77
 deficiência congênita, 69, 79, 81

fatores da coagulação
 ativação dos, 74, *80*
 identificação dos, 78
 propriedades dos, *79*

fatores de ação trans *See also* genes, *See also* transcrição; *See also* fatores de transcrição

fatores de alongamento, eEF-1A, *440*

fatores de crescimento
 na aterogênese, *231*
 regulação do ciclo celular, 594

fatores de transcrição
 ativação de, 594
 genes, 450-452
 osteoclastos, controle dos, 338-339
 PPAR-γ, papel regulatório do, 224, 272, *273*
 receptores intracelulares como, 552
 translocação nuclear dos, 594

fatores estimuladores de colônia, 511

fatores reguladores miogênicos (MRFs), 261

fenil isotiocianato (PITC), 18

fenilalanina, 6, 65
 degradação da, *249*

fenilalanina hidroxilase, 249

fenilalquilamina, 95

fenilcetonúria (PKU), 249

feocromocitoma, 586

fermentação, 147-148

ferricitocromo c (Fe^{3+}), 106

ferritina, íons metálicos, transporte de, 36-37

ferro
absorção, 138
deficiência, 103
estado e tradução do mRNA, 456, *457*
metabolismo, *299*
no CNS, 571
requerimento alimentar de, 299-300

fezes
e excreção de colesterol, 213-214
excreção de cálcio nas, 343

fezes, excreção de gordura nas, 122

fibratos, agindo através do PPAR-α, 234-235

fibrilina, 13

fibrina
D-dímeros, 83
digestão da, 75
e hemostasia, 73-74
lise de, 75
produtos da degradação de (FDP), 75
trombo, 78

fibrinogênio, 40, 69
deficiência, 77
e plasma, 33

fibrinólise, 68, 74, 83-84

fibronectina, 382
mapa estrutural da, *383*

fibrose cística (CF), 91, 92

fígado, 11
ação do glucagon no, 270-271
ácidos biliares sintetizados no, 211-213
armazenamento de vitamina A, 130
ativação da glicogenólise no, *162*
câncer, 392
cetogênese no, 189-192

cirrose do, *397*
classificação das desordens, 400-402
como órgão produtor de glicose, em jejum, 274-275
complexo hemoglobina-haptoglobulina, 37
doença obstrutiva, devido ao câncer pancreático, 402
e insulina, 269
e metabolismo de carboidrato, 391
e vitamina B_{12}, 137
estrutura do, 389-390
extrato, 18-19
falência do, 81
gliconeogênese no, 156-157
glicose captada ou produzida no, 391
gravidez, fígado gorduroso agudo da, 192
metabolismo de proteína no, 391-393
metabolismo, papel no, 389-402
no estado de jejum, 274-275
proteoglicanas no, 387
remoção do colesterol pelo, 211
síntese de proteína, 391-392
testes bioquímicos das funções, 399
vitamina A armazenada no, 130

filoquinona, 130

filtrado glomerular, 313

flavina adenina dinucleotídeo (FAD), 2
como a principal enzima redox, 100
e riboflavina, 135
grupos prostéticos, 103

flavina mononucleotídio (FMN)
como a principal enzima redox, 100
e riboflavina, 135
grupos prostéticos, 103

flavoproteínas
contendo FAD, 103
contendo FMN, 103
mitocondriais, 102

fluido extracelular (ECF), *307*
e rins, 312

fluido intracelular (ICF), *307*

íons presentes no, *308*

fluidos *ver também* fluido corporal
extracelular (ECF) *See* fluido extracelular (ECF)

fluidos corporais, composição iônica dos, 309

fluorescência, 16
hibridização *in situ* (FISH), 485

fluoreto, inibição da enolase, 148

fluoroacetato, toxicidade do, 177, *178*

fluorodesoxiuridilato (FdUMP), 411

fluorofosfatos, orgânicos, envenenamento por, 70

focalização isoelétrica (IEF), 17

folatos, reciclagem, 411

folha β-plissada, 11, 12, 20

Força-Tarefa de Serviços Preventivos, USA, 139

forma da proteína príon celular (PrPC), 20

forma da proteína príon *scrapie* (PrPSc), 20

formaldeído, 24, 66

formato, 66

fosfatase alcalina (ALP), 399

fosfatidilcolina
e fosfolipídios, 28, 29
formação da, *368*

fosfatidiletanolamina, e fosfolipídios, 28-29

fosfatidilinositol
bifosfato (PIP_2), 559, *560*, 561
ciclo de sinalização, *560*, 596
e fosfolipídios, 29

fosfatidilserina, 29

fosfatos
alta energia
estrutura dos, *100*
transdução de energia a partir de coenzimas reduzidas para os, 100-101
como principal mineral, 298-299
concentrações no soro, 346
e hormônio da paratireoide, 340
e quinases celulares, 69
tampão, 327

fosfatúria, 89

fosfodiesterases, 161
término do sinal de AMPc pelas, 556-557

fosfoenolpiruvato (PEP), 147

fosfofrutoquinase 2/frutose-2,6-bifosfatase (PFK-2/Fru-2,6-BPase), 169

fosfofrutoquinase-1 (PFK-1), 149
regulação alostérica da, *149*

fosfofrutoquinase-2 (PFK-2)
regulação da glicólise pela, *271*
regulação da gliconeogênese pela, *271*

fosfoglicerato quinase (PGK), 147

fosfolipases, 562-563
C (PLC), 162

fosfolipídios, 28-29
ácido fosfatídico como precursor de *28*, 367
bicamada, 206
biossíntese de, 367-369
e modelo do mosaico-fluido, 30
e resposta na fase aguda, 40
função surfactante dos, 122, 369
no fígado de rato, 29, *30*
renovação (*turnover*) de, 370
vias de interconversão, *369*

fosforilação, 14
e vias metabólicas, 272

enzima, papel regulador da, *273*
nível de substrato, 145-147, 148
oxidante, 2, 102, 113, 187
regulação da, 113-114
tirosina, 7

fosforilação oxidante, mecanismos de, *101*

fosforilase, 157

fotofobia, 135

frações citosólicas, 14

fraqueza, nos membros, 575

fritura, 28

frutose, 2, 23
conversão a glicose, 169-170
metabolismo da, 24, 26, 356-357
na digestão, 120

frutose-1,6-bifosfatase (Fru-1,6-BPase), 145, 149
deficiência, 169

frutose-2,6-bifosfatase (Fru-2,6-BPase), 169

frutose-6-fosfato (Fru-6-P), 144, 359

fucose
da glicose, 355-356
metabolismo, 356-357

fumarase, 182

função renal, avaliação da, 261, 315-320

furano, 24

G

galactose
 e açúcares simples, 23
 e glicanas complexas, 25
 formação da, 355-356
 interconversão
 a glicose, 169-170
 a partir da glicose, 355-356
 metabolismo, 26, 356
 na digestão, 118, 120
 produtos diários, derivados da, 118

galactosemia, 26, 357

gama globulinas *See* anticorpos; *See also* imunoglobulinas

gamopatias monoclonais, de significado indeterminado (MGUS), 40

Ganciclovir®, 69

gânglio da raiz dorsal, 570

gangliosídios
 estrutura e nomenclatura dos, 371-372
 formação, *372*
 receptor para a toxina colérica, 375

gangliosidoses, 372

gastrina, 96, 121

gel filtração, 15-16

gel polimérico, 16

genes
 acentuadores (*enhancers*), 450
 alvo, inserção em plasmídeos, *468*
 ataxia telangiectasia mutada ATM, 600
 ativação alélica preferencial, 457-458
 Bcl-2, 600
 detecção de deleções nos, 474
 elementos de resposta, 450

expressão de
eficiência e especificidade da, 449
insulina, 165
mecanismos básicos da, 447-452
metilação do DNA, 454-455, *487*
microarranjos, 488-490
processos de, 447
regulação da, 447-458
tecido-específica, 455
expressão tecido-específica, 455
fibrilina, 13
marcador, 468
(micro)arranjos
ferramentas para o estudo da expressão, 488-490
fluxograma experimental dos *49*
mutações, estudos por sequenciamento, 485-486
promotores, 448-450
acesso, 454
alternativos, 449-450
elementos-chave dos, *449*
regulação dos
metodologias alternativas para, 454-458
resistência a antibióticos, 468
transcrição
elementos-chave requeridos para, 448
fatores, 450-452
iniciação da, 451
versus unidades de transcrição, 451

genes supressores de tumor, 606

genética
e distúrbios de sangramento, 73
humana, 1

genitália, ambígua, 214

genoma, 2
estudos sobre o, 481-482

genoma, humano, desacoplamento de proteínas, 110-111

genoma humano *See* genoma, humano

genótipo, e concentração plasmática de nutrientes, 295-296

gigantismo, e excesso GH, 547

glândula pituitária
anterior, 531-532
desordens da, 541, 542, 544
falência da, 537
posterior, 531-532

glicanas, conteúdo informativo das, 25

gliceraldeído, 118

gliceraldeído-3-fosfato, 145
desidrogenase (GAPDH), 146-147, 148

gliceraldeídos, e carboidratos, 23

glicerofosfolipídios, 28 *See also* fosfolipídios
síntese e renovação (*turnover*) de, 367-370

glicerol
e triglicerídios, 28
esqueletos de carbono provenientes do, 166
ésteres, 265-266
fosfato, lançadeira, 103
gliconeogênese a partir do, 166, *167*, 168
lipídios, digestão118

glicerol-3-fosfato (glicerol-3-P)
lançadeira, 104
Q redutase, 103

glicerol-3-P desidrogenase, 104

glicina, 8, 13
aminoácidos, 5
como neurotransmissor, 584-585
e ácido fólico, 136
e alanina, 25
e folha β-plissada, 12

glicoconjugados, 1, 2

glicocorticoides, e óxido nítrico endotelial, 76

glicoesfingolipídios, 26

glicoforina, 31

β-glicofuranase, *25*

α-glicofuranose, *25*

glicogênio, 1
 absorção de, 118
 armazenamento, 23
 estrutura do, 156
 glicose armazenada como, 265
 hepático, mobilização pela epinefrina, 161-163
 sintase, inibição máxima da, 163
 sistema de amplificação em cascata, *159*

glicogênio, síntese, 2

glicogenólise, 2
 ativação no fígado, *162*
 hepática, regulação hormonal da, 158
 no músculo, 163-165
 sítios de ligação para bactérias/toxinas bacterianas, 375
 vias da, no fígado, 157-158

glicogenólise, e estresse, 278

glicolipídios, 29, 371, *372*
 como sítios de ligação para bactérias, 375
 defeitos na degradação, 372-373

glicólise, 2
 anaeróbia, 143
 em leveduras, *148*
 catalisada por enzimas, 143
 e cáries dentárias, 148
 e regulação da fosforilação, 113
 em células tumorais, 150
 estágio de divisão, 144, 145, *146*
 estágio de investimento, 144, *146*
 estágio de produção, 144, 145-147, *146*
 interações com outras vias, *145*
 regulação nas células vermelhas sanguíneas, *149*
 regulação nos eritrócitos, 148-149
 regulação pela fosfofrutoquinase, *271*

gliconeogênese, 2, 165-170

a partir da alanina, 275
a partir de aminoácidos, 166, *167*, 168
a partir do glicerol, 275
a partir do lactato, 166, 175
definição, 155
e homeostasia da glicose, 266
em jejum e inanição, 156, 189-191
mobilização de lipídios durante a, 191-192
regulação da, 168-169
substratos para, 275
via da, *167*

gliconeogênese, e estresse, 278

glicopeptídio, 39

β-glicopiranose, *25*

α-glicopiranose, *25*

glicoproteínas, 2, 8
cadeias oligossacarídicas das, 363-364
estruturas
geral, 353-355
modelo de, *352*
função dos carboidratos nas, *352*
hormônios, estrutura dos, *541*
inibidores da biossíntese, 362
ligações, *352*
ligações *N* e *O*-glicosídicas, 25
receptores, 77

α-1-glicoproteína ácida, 41

glicoquinase, propriedades da, *63*

glicosamina, *26*

glicosaminoglicanas (GAGs), 82

glicose, 2
ácidos graxos, incapacidade de ser sintetizado a partir de, 168
armazenamento de, 265
compostos não carboidratos, sintetizados a partir de, 265
conversão a partir da frutose, 169-170
conversão a partir da galactose, 169-170

conversão a partir de aminoácidos, 266
desidrogenase (GDH), 70
e açúcares, 23
e células normais, 355
e glicanas complexas, 25
ensaio oxidase-peroxidase, 70
glicogênio, armazenado como, 265
hemostasia, 265-289
homeostasia, *266*
intolerância, *283*
metabolismo anaeróbio da, 143-154
metabolismo da, 267
na digestão, 115, 120
Na^+/K^+, papel no consumo, 93-95
produção de energia, *188*
produção no fígado, em jejum, 274-275
reagente oxidase-peroxidase (GOP), 70
representações linear e cíclica da, *25*
retomada ou produzida no fígado, 391
síntese de, 265
transporte de, 269
utilização pelas células vermelhas sanguíneas, 144

glicose plasmática
após infarto do miocárdio, 280
diagnóstico da diabetes, 284-287
quantificação, 287

glicose sanguínea, 2
ensaio de redução de açúcar para, 26
fontes de, *155*
medição da, enzimática, 70-71 *See also* glicose
vias hepáticas da glicogênese, 156-157

glicose-6-fosfatase (Glc-6-Pase), *26*

glicose-6-fosfato (Glc-6-P), *63*, 144
desidrogenase (G6PDH)
deficiência e anemia, 153
e glicogênese, 156
e glicogenólise, 157
glicólise, estágio de investimento, 144

α-glicosidase, 121

glicosil, ligações, 121

glicosilação, 14

glicosilfosfatidilinositol (GPI)
 âncoras
 defeitos nas, 370

glicosúria, 89

globinas, características, 43-49

globulina ligadora da tireoide (TBG), 41

glomerulonefrite membranoproliferativa, 35

glomérulos, renais, 312-313

glucagon, 2
 ação no fígado, 270-271
 efeitos do, *271*
 efeitos dos hormônios, 270-273
 inibido pelas refeições, 274
 mecanismo de ação do, 158, *159*, 160-161
 resposta hormonal ao, *160*
 sistema de amplificação em cascata, *159*

glucan, 26

glutamato, 8, 13, 18
 como neurotransmissor, 583-585
 descarboxilase, 584
 e excitotoxicidade, 583-584
 excesso, toxicidade para células nervosas, 584
 relação com glutamina, *240*
 relação com α-cetoglutarato, *240*
 síntese de GABA a partir de, 243, 584-585

glutamato monossódico, 239

glutamil hidrolase (conjugase), 136

γ-glutamil transpeptidase (GGP), 11

glutamina, 7, 13, 18
 e enterócitos, 115
 na digestão, 115
 papel central da, 241
 relação com glutamato e α-cetoglutarato, *240*

glutaraldeído, 24

glutationa, 11
atividade antioxidante da, *153*
e deficiência de riboflavina, 135
e via da glioxalase, 506
e via da pentose fosfato, 152
estrutura da, 11, *153*
peroxidase, 141, 152

glúten, 126

Gly-Xaa-Pro/Hyp (unidades tripeptídicas), 12

gordura
agentes semelhantes a hormônios envolvidos no armazenamento total, 203
armazenamento em resposta à alimentação, *202*
digestão e ácidos biliares, 213
metabolismo, 185, 394

gorduras, 2
emulsificação de, 121-122
monoinsaturadas, 26, 298
poli-insaturadas, 298
proveniente de alimentos, 297
saturadas, 298
transporte e armazenamento, em resposta à alimentação, *202*

gota
e hiperuricemia, 408
excesso de ácido úrico, 407
tratamento com alopurinol de, *407*

gradiente cromatográfico, 16

gradientes
de potássio, 308
de sódio, 308
iônico, 575

gradientes eletroquímicos, 93

gráfico de Eadie-Hofstee, 64

gráfico de Gompertz, *610*

gráfico de Lineweaver-Burk, 64, 65

gráfico de Michaelis-Menten, *64*

grânulos secretórios, 14

gravidez
 adaptações metabólicas a, 296
 anemias megaloblásticas na, 136
 fígado gorduroso agudo da, 192
 prolactina na, 547

grupo metil tioéter, 8

grupo α-amino
 e cadeias peptídicas, 11
 e prolina, 8

grupos amino ($-NH_2$), 5, 8, 13, 24

grupos butil, 6

grupos carboxil (−COOH), 5, 8, 10, 11, 13

grupos hidroxil, 24

grupos isobutil, 6

grupos metil, 6

grupos metileno, ácidos graxos, 26

grupos prostéticos, aminoácidos, 5

grupos sec-butil, 6

GSH(peptídio), 11

GSSG (dissulfeto), 11, 153

GTPase *See* guanosina trifosfatase

guanilato ciclase, 76

guanosina
 difosfato-manose (GDP-Man), 358-359
 trifosfato (GTP)
 síntese de, 404

guia da *Joint British Societies* (JBS2), 233

H

Halobacterium halobium, 31

haptoglobina, 41

Hayflick, L., 610

α-hélice, 11, 12, 30, 44

Helicobacter pylori, erradicação do, 96

hematúria, 153

heme
- C, 106
- cuproenzimas envolvidas na produção do, 106
- e vitamina B_{12}, 137
- estrutura da porfirina do, *45*
- estrutura do grupo prostético, 45
- ferro, 36
- proteínas, 43
- síntese, 393
- variação na estrutura entre citocromos, *106*

hemocromatose, 300

hemodiálise, 66

hemofilia
- causada por zimogênios, 69
- congênita, 79

hemoglobina (Hb), 13
- A (HbA_{1c}), 54
- agregados de ligações dissulfeto cruzadas da, 153
- artificial, 50
- cianeto ligado a, 112
- cromatografia da, *54*
- curvas de saturação de O_2 para, *46*
- e complexos ferro-enxofre, 104
- e eritrócitos, 33, *34*
- efeito da temperatura, 50-51

efeito do CO_2, 50-51
estado T e R, 47, 48
fetal, 53, 150
glicada, medição, 287
interações com NO, 52
interações com O_2, 47
ligação de O_2 pela, 68-69
livre, 37
modulação alostérica da afinidade por O_2 da, 49-52
monóxido de carbono ligado a, 112
separação de variantes e mutantes, 55
subunidades de globina, *47*
transporte de O_2 pela, 43
transporte de O2 pela, 46
variantes normais, 53

hemoglobina glicada, 287

hemoglobinopatias
classificação e exemplos de, *48*
diagnóstico de, 55

hemoglobinúria paroxística noturna (PNH), 370

hemolisado, 55

hemólise, 37, 55

hemólise, elevado, enzimas hepáticas e contagem baixa de plaquetas *See* síndrome de HELLP

hemossiderina, 36, 37

hemostasia, 73-75
e trombina, 74, 81

hemostasia
parada do sangramento, significado, 73
requerimentos para, 73-74

hemostasia, glicose, 2

heparan sulfato, degradação de, *386*

heparina, 385
efeito anticoagulante da, 82

heparinato de lítio, 33

hepatite, isozimas LDH, *61*

hepatócitos
 e bilirrubina, 394
 e fígado, 390

hepatomegalia, fundamento bioquímico para, 397

hepatotoxicidade, 135, 139

hepatotoxicidade, drogas, 396-397

herança, estudo utilizando repetições microssatélites, 475

heterodímeros, 47

hexoquinase, 148-149, 156
 propriedades da, *63*

hexoses, estruturas das, *24*

hibridização
 DNA
 efeito da composição das bases, 461
 efeito do comprimento da fita, 461
 polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs), 471-472
 princípios da hibridização molecular, 461-462
 propriedades de anelamento, 461
 sonda-molde, *463*
 sondas de ácidos nucleicos, *462*
 dot-blot, 472
 fluorescência *in situ* (FISH), 485
 genômica comparativa (CGH), 484
 heteroduplex, sonda-alvo, 461-462
 microarranjo, 464, *465*
 princípios, 461-462
 sondas, marcação, 462-467
 Southern blots, 464-465
 utilidade da, 461-462

hidrocarbonetos, saturados, 6

hidrocloreto de guanidina, 13

hidrofilicidade, aminoácidos, 8

hidrofobicidade, 18, 88

hidrogênio
átomos (−H), 5
e grupos hidroxil, 24
excreção de, 331
íon (H^+), 10
concentração *See* pH (concentração do íon hidrogênio)
pontes, 11-12, 13

hidrolases, 61, 118

hidrólise, 17, 18
absorção lipídica, 121
de TAGs, 122
termodinâmica da, *99*

3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA)
e ácido mevalônico, 207
redutase
inibidores da, 234
regulação da atividade, 210
como uma enzima taxa-limitante, 206-207

hidroxiapatita, na matriz óssea, 337

hidroxicobalamina, 137

25-hidroxicolecalciferol ($25(OH)D_3$), 340

hidroxila anomérica, 25

7α-hidroxilase, 210

21-hidroxilase, deficiência, 214

hidroximetilglutaril (HMG)-CoA, 190
fosfato (NADP), reduzida (NADPH), 207

hidroxiprolinas, 13

5-hidroxitriptamina (5-HT) *See* serotonina

hiperaldosteronismo e hipertensão, 318

hiperamonemia hereditária, 244

hipercalcemia, 39, 343-346
associada a malignidade (HCM), 343, 345
causas da, 343
dois principais mecanismos da, 345
em neonato, 346
investigação da, 343-344
sintomas e sinais da, *344*
testes para causas não paratireoidianas, 344

hipercolesterolemia, 209, 229
familiar, 228

hipercolesterolemia familiar, e ataques cardíacos, 228, 229

hiperfenilalaninemias, 249

hiperglicemia, 270
e diabetes, 279
e pancreatite, 122

hiper-homocisteinemia, 136

hiperinsulinemia, 269

hiperinsulinemia persistente familiar
hipoglicemia da infância (PHHI), 92, 94

hiperlipidemia, 225, 228

hiperlipidemia familiar combinada, 228

hiperóxia, toxicidade da, 501

hiperparatireoidismo (HPT)
e hipercalcemia, 343
primário, 344
secundário, 346

hiperparatireoidismo primário *See* hiperparatireoidismo

hiperparatireoidismo secundário *See* hiperparatireoidismo

hiperplasia congênita suprarrenal, 214, *539*

hiperplasia da suprarrenal, congênita, *539*

hiperpolarização, 581

hiperprolactinemia, 547-548

hipersensibilidade, 1
 e fator de ativação de plaquetas (PAF), 29

hipertensão
 arterial, natureza comum da, 322
 causa neurotransmissora, 586
 e doenças cardiovasculares, 282
 e hiperaldosteronismo, 318
 tratamento diurético para, 320

hipertermia maligna, 259

hiperuricemia, e gota, 408

hiperventilação
 causa de alcalose respiratória, 328
 e doença aguda da montanha, 52
 estudo de caso, 53

hipoalbuminemia, 35, 36

hipocalcemia, causas da, 346

hipoglicemia, 274
 após álcool, 168
 causas da, *274*
 complicação diabética, 281
 e epinefrina, 161
 e intolerância à frutose, 358
 em criança de mãe diabética, 163
 em criança de mãe subnutrida, 163
 grave, 289
 medicação para, 288

hipogonadismo, *543*

hipoparatireoidismo, 346
 magnésio no, 347

hipotálamo, desordens do, 541, 542, 544

hipotensão, 29

hipótese quimiosmótica, 107-111

hipotireoidismo, 535
 e deficiência de riboflavina, 135

hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRT), deficiência, 408

hipóxia, crônica, 52

hirsutismo, 544

Hirudo medicinalis, 81

histamina, 96, 121

histidina, 8, 13, 45

história alimentar, 303

HIV *See* vírus da imunodeficiência humana

HMG-CoA *ver* 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA

holoenzimas, 62

homeostase, glicose, *266*

homocisteína, 13

homocisteinúria, 13

homocistinúria, 137, 246
 deslocamento do cristalino na, 13

hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), 536

hormônio antidiurético (ADH) *See* vasopressina

hormônio da paratireoide (PTH)
 cálcio e fosfato ionizados, alterações no, 340
 e hipocalcemia, 346
 e pseudo-hipoparatireoidismo, 346
 quantificação do, 341
 resistência tecidual ao, 346
 síntese e principais ações, *341*

hormônio de crescimento (GH)
 ações bioquímicas do, 545-546
 controle da, 545

eixo, 545-547
secreção
distúrbios clínicos de, 547
em crianças, 545

hormônio de liberação de corticotropina (CRH), 535-536

hormônio estimulador da tireoide (TSH), 533

hormônio folículo-estimulante (FSH), 540-541
ação nos ovários, 543-544
ação nos testes, 541
variações de nível com a idade, *542*

hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), 540

hormônio liberador de tireotropina (TRH), 532-533

hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH), 545

hormônio luteinizante (LH), 540-541
ação nos ovários, 543-544
ação nos testes, 541
variação do nível com a idade, *542*

hormônios
ação, princípios de, 526-528
acoplamento de resposta a estímulos relevantes, 526
ensaio de ELISA, *531*
agentes semelhantes aos hormônios envolvidos no armazenamento total, 203
anti-insulínicos, 270-273
avaliação bioquímica da ação, 529
características de controle dos, 528
derivação química dos, *526*
desligando o sinal, 527
diversidade química dos, 525
e hemostasia do cálcio, 340-343
eixo hipotálamo-pituitária-gonadal, 540-544
eixo hipotálamo-pituitária-suprarrenal, 535-540
eixo hipotálamo-pituitária-tireoide, 532-535
imunoensaio, 530
intestinal, 289
intestino, 267
livres, 527-528
metabolismo em tecidos-alvo, 528, *529*
metabolismo local em tecidos-alvo, 528, *529*

paratireoide *See* hormônio da paratireoide (PTH)
produção de, 525-526
proteínas de ligação, exemplos, *528*
quantificação de, 530-531
receptores, 551-553
regulação de enzimas, 272
retroalimentação (*feedback*), 527
sistema regulatório hipotálamo-pituitária, 531-532
tipos de, 525-526
transdução de sinais em tecidos-alvo, 527

hormônios anti-insulina, 270, 278

hormônios esteroides, 213-216
ações dos, 216
em mulheres, 544
biossíntese de, 214-215
desordens de secreção, em mulheres, 544
eliminação dos, 216
estrutura e nomenclatura dos, *215*
excreção dos, 216
membranas celulares, atravessando, 551-552
precursores dos, 214

hormônios tireoidianos
e proteínas desacopladoras, 111
regulação pelos, 114

I

icterícia
 após amamentação, 357
 causas da, 393-394, *400*
 causas genéticas da, 398
 diagnóstico diferencial da, *398*
 intra-hepática, 400, *401*
 neonatal, 401
 pós-hepática, 400, *401*
 pré-hepática (hemolítica), 400, *401*

III Painel de Tratamento de Adultos (ATPIII) do Programa Nacional de Educação para o Colesterol, EUA, 233

imagem de tomografia computadorizada (CT), 122

iminoácidos, 6

α-iminoácidos, 5, 8

impressão digital de massa de peptídio (PMF), 492
 identificação de proteínas pela, *493*

imprinting genômico, 432

imunidade, antiparasitária, 40

imunocompetência, 138-139

imunocomprometimento, 138-139, 519

imunodeficiência combinada grave ligada ao X (X-SCID), 598

imunoensaios, 83
 hormonais, 530

imunoglobulina A (IgA), 39

imunoglobulina D (IgD), 39

imunoglobulina E (IgE), 29, 39-40

imunoglobulina G (IgG), 39

imunoglobulina M (IgM), 39

imunoglobulina, e albumina, 16

imunoglobulinas, 16
cadeias de junção (J), 39
cadeias leves (L), 37-38
cadeias pesadas (H), 37-38, 39, 39-40
cadeias γ, 39
definição, 37, 41
estrutura das, 37-38
eventos de recombinação gênica variáveis, 514
monoclonais, 40, 41
na síndrome nefrótica, 35
principais, 39
região constante (Fc) adicional, 38
secundárias, 39-40

imunoglobulinas do soro humano, 14

imunoglobulinas monoclonais, 40, 41

imunologia, regional, 571

inalação, 1

inanição
e rede de síntese de glicose, 277-278
gliconeogênese na, 189-191

índice de massa corporal (BMI), e estado nutricional, 300

índice de refração, 16

indometacina, 67

infantes prematuros
deficiência de vitamina K, 133
fórmulas alimentares para, 106

infarto do miocárdio
alterações nas enzimas do soro após, *262*
diagnóstico do, 262
isozimas LDH, *61*
lesão por isquemia/reperfusão, 502
na doença de Fabry
nível de glicose plasmática após, 280

tratamento antitrombótico no, 84
troponinas cardíacas, quantificação, 262

infertilidade, 544

inflamação, 2
células envolvidas na, *509*
e aterogênese, 229, 231
e íons metálicos, transporte de, 36
enzimas, inibição, 67 *See also* respostas imune

ingestão alimentar de referência (DRI), 294-295

ingestão de comida, regulação da, 291-292

inibidor da via de fator tecidual (TPFI), 83

inibidores
monoamina oxidase (MAOI), 586

inibidores da coagulação, 81-83
propriedades dos, *83*

inibidores de proteinases, 40

inosina
monofosfato (IMP)
síntese de, 403-404

inositol
1,4,5-trifosfato (IP_3), 561
trifosfato (IP_3)
análise estrutura-função, 561
microinjeção dentro das células, 561

inquietação, deficiência de tiamina, 135

inseticida, envenenamento por, 70

insuficiência primária da suprarrenal, 538

insulina, 2
ação da, 268
concentração intracelular de ATP requerida para, 111
e adiponectina, 292
e expressão gênica, 165

efeitos metabólicos da, 268-270
estimulada pelas refeições, 274
mecanismos de ação, *165*
molécula, 266-267
no tecido adiposo, 269
recombinante, 467-468
resistência, 203
avaliação da, 270
e adiponectina, 292
e ataque cardíaco, 289
e diabetes do tipo, 2, 269-270
e sinalização defeituosa, 270
induzida por estresse, 278-279
sítios de, *270*
tratamento para, 288
secreção de, 267
sensibilidade dos fatores de transcrição à, 272
sinalização, *268*

integrinas, 517

interações célula-célula, 2, 25, 359

interações célula-patógeno, 25

interações hidrofóbicas, 13

interferons (IFNs), 511

interleucinas (ILs), 511

intestino
ácidos biliares no, 213
células epiteliais do, 125
delgado *See* intestino delgado
hormônios, 289
inibição da absorção, 235
revestimento do, 116
secreções, volume e pH das, 116-117

intestino delgado
absorção de cálcio no, 343
absorção de lipídios, 122
e intolerância à lactose, testes para, 126
revestimento do, 116
selênio absorvido a partir do, 141

intestino, distúrbios inflamatórios do, 41

íntrons, *splicing* do mRNA, 455

iodoacetato, 18

iodotironina 5-deiodinase, 141

íon cúprico, 26

íon guanidínico, 8

íon imidazólico, 8

ionização e dessorção a *laser* assistida por matriz acoplada ao tempo de voo (MALDI-TOF), 20

ionóforos
 efeitos bactericidas dos, 88
 mecanismo de transporte dos, *88*

íons
 cálcio, 557-558, 575
 canais, 582
 dipolar (*zwitterion*), 8, 10, 11
 gradientes, 575
 hidrogênio, 10
 no plasma e fluido intracelular, *308*
 permeabilidade, 88
 redox-ativo, sequestro ou quelação, 503-505
 sequestro ou quelação, 503-505

íons metálicos
 como componentes de proteínas, 140
 transportadores de proteínas, 36-37

isocitrato desidrogenase, 180

isoleucina, 6

isomaltose, *27*

isomerases, 61-62, 152

isômeros
 estéreo, 5-6
 glicanos, informações sobre o conteúdo, 25
 oticamente ativos, 5

quirais, 5

isoniazida, 135, 136

isopreno, unidades, 207-208

isozimas, *61*
especificidade tecidual do LDH, 62
glicoquinase, 63
hexoquinase, 63

isquemia, lesão por reperfusão, 502

J

jangadas lipídicas, 31

Janus quinases (JAKs), 597

K

katal (kat), 60

Keto-Stix, 191

kwashiorkor, 302

L

laboratório clínico, função do, 34, *35*

lactato
 acúmulo, 66
 como substrato para a gliconeogênese, 166
 desidrogenase (LDH), 147
 isozimas, 62
 esqueletos de carbonos provenientes do, 166
 quantificação do, 175

α-lactoalbumina, 357

lactose, *27*
 biossíntese de, 357
 como uma dissacaridase da borda em escova não induzível, 119
 intolerância, 126
 na digestão, 118
 sintase, 357

lacuna de ânion, 308

lamininas, 383

lançadeira de carnitina, 186

lançadeira redox, *105*

lançadeiras de elétrons, 104

lanosterol, 208

L-arginina, 7

latirismo, 380

lecitina, 28

lectinas
 interações com açúcares, 363-364
 toxicidade das, 365

leite de vaca, 106

leptina, do tecido adiposo, 201-202

lesão por reperfusão, 502

Leu (resíduo de aminoácido), 11

leucemia linfocítica aguda, 136

leucina, 6, 246

leucócitos, 33-34

leucotrienos, 566
 e aterogênese, 231-232
 precursores dos, 564-565

levedura, 14, 148

L-glicose, 24

ligações carbono-carbono (C-C), 12

ligações glicosídicas, 25

ligações peptídicas, 11-12
 estrutura das, 11
 formação e translocação, *441*

ligações, não covalentes, *48*

ligantes, 16
 bloqueados pelos, 90
 de proteínas transportadoras, 35
 proteínas plasmáticas, ligadas com, 35
 RANKL, 338

ligantes de amidas, 11-12

ligases, 62

limite de Hayflick, 609-610

linfócitos
 células B, 37, 39
 imunoglobulinas monoclonais, 40
 maturação na medula óssea, 516
 moléculas coestimulatórias, 513

receptor de antígeno, 513, 515
seleção clonal nos, *517*
subconjuntos de, *518*, 520
células T, 37
apresentadora de antígeno, 516-517
aterogênese, 231
classificação das, 518-519
desenvolvimento no timo, 516
e MHC, 514
moléculas coestimulatórias, 513
placas ateroscleróticas, 232
receptor de antígeno (TCR), 513
regulatórias, 519
resposta, 518
células T auxiliares (TH), 518-519
células T citotóxicas (CTL), 519
células T regulatórias, 519
e resposta imune adaptativa, 513

língua, deficiência de riboflavina, 135

lipação, 14

lipase triglicerídica hepática (HTGL), *222*

lipases
deficiências, 228
e pâncreas, 122
lingual, 117
mobilização lipídica, 191

lipídios, 1, 26-29
absorção dos, 121-124
anormalidades no alcoolismo, 199
complexos, 367-376
deposição, 227
digestão de, 118, 121-124
doenças de armazenamento, 373
emulsão, 122
entrada na parede arterial, 229-230
essenciais, 298
estrutura dos, *28*
membrana, estrutura dos doadores, *369*
metabolismo dos
e metabolismo de aminoácidos, 245
regulação pela epinefrina (adrenalina), *192*

regulação pelo glucagon, *192*
metabolismo oxidante dos, 185-193
mobilização durante o trabalho e gliconeogênese, 191-192
na comida, 115
solubilização, 122-123
transporte de, por quilomícrons, 222
via da peroxidação, *503*

lipídios, variação no tamanho, 23

lipogênese, 2, 136, 195

lipólise, 2

lipoproteína (a), similaridades com o plasminogênio, 221

lipoproteína lipase (LPL), 222

lipoproteínas, 219-221
alta densidade (HDL), 224, *225*
anormalidades no metabolismo, *227*
baixa densidade (LDL)
modelo, *354*
receptores, 210, 226, *230*, *354*
classes de, *220*
deficiência de lipase, 228
metabolismo, 219, 222
partículas, 219-220
plasmáticas, 219-220
receptores
alta densidade (HDL), 220
baixa densidade (LDL), 220
densidade muito baixa (VLDL), 220, 222-223, 225
partículas remanescentes de, 223
removedores (*scavengers*), 221-222, 512
separação por ultracentrifugação, 220
via de extravasamento, *223*, 226
via de transporte de combustível, 222-223
vias metabólicas, 222-224

lipossomas, 29

líquido cerebroespinhal (CSF)
células circulantes, 570
fontes de, *570*
vazamento, 570

lisil endopeptidase, 18

lisil oxidase, inibição da, 380

lisina, 11, 13, 18

lisossomos, 14
 acúmulo de cistina nos, 89
 enzimas lisossomais, alvo dos, *364*

lisossomos, 92

longevidade
 e atividade de reparo do DNA, *611*
 e restrição calórica, 617-618

lúmen, intestinal, *95*

M

macrófagos, 29
 surto respiratório nos, 506
 transformados a partir dos monócitos, 511

macroglobulinemia de Waldenström, 40

macroprolactina, 548

macrossomia, 163

magnésio
 como principal mineral, 298-299
 e metabolismo de ATP, 101
 no hipoparatireoidismo, 347

malato
 desidrogenase
 no ciclo do TCA, 182
 lançadeira, 198-199

malignidade, e hipercalcemia, 343, 345

malonil-CoA, 186
 síntese a partir de acetil-CoA, 195-196

maltose, *27*, 118, 121

maltotriose, 118, 121

manganês, 140

manose
 a partir da glicose, 355-356
 alta, 352, 353, *361*., 363
 e açúcares simples, 23
 receptores, 512

marasmo, 302

mastigação (*chewing*), 115

mastócitos, 39-40

e heparina, 388

matriz extracelular (MEC), 2, 31
colágenos na, 377-381
e a engenharia dos tecidos, 388
proteínas não colágenas na, 381-383

mecanismo de mudança de ligação, ATP sintase, 107, *108*

mecanismos de reparo, 2

medula óssea, maturação de células B na, 516

megacariócitos, 34, 77

MELAS (episódios semelhantes a acidente vascular encefálico), 113

membrana de borda em escova, 119-121

membrana plasmática, fluido intracelular e extracelular, separação, 308

membranas
biológicas, 1
borda em escova, 119-121
diálise, 15
movimento dos solutos através, *88*
permeabilidade das, 88
proteínas de ancoragem, 31

membranas biológicas, 1
e lipídios, 26
e lipossomas, 29
modelo de mosaico-fluido das, 30-31

membranas celulares, 269, 308-309
alterações no fluxo iônico, 580-581
entrada de hormônios esteroides, 551-552

memória imunológica, 512, 517

menaquinonas, 130

mensageiros secundários, 554-566
lipídicos
cadeias laterais dos ácidos graxos, *564*

β-mercaptoetanol, 17, 18

2-mercaptoetanol (MeSH), 8, 19

metabolismo, 1
 água, *280*
 aminoácidos, 2, 237-239
 anaeróbio, 113
 da glicose, 143-154
 avaliação laboratorial do, 284-287
 bilirrubina, 393-394
 carboidratos, 2
 central, 237, *238*
 constantes de equilíbrio no, 98-99
 da frutose, 24, 26, 356-357
 da vitamina D, *342*
 de drogas
 papel do citocromo P450, 395, 396
 de esqueleto de carbono, 239, 245-247
 de nucleotídios glicosilados, 358-362
 e AMP cíclico, *556*
 e cortisol, 536
 e diabetes, 280-282
 em estado de jejum, *277*
 ferro, *299*
 galactose, 26, 356
 gordura, 185, 394
 inibidores, 111-112
 jejum prolongado, 277-278
 lipídio, 2
 lipoproteína, 222
 ósseo, 337-349
 oxidante, 1, 2
 pirimidina, 408-409
 pós-prandial, *275*
 purina, 403-408
 taxa metabólica basal (BMR), 97-98

metabolismo pós-prandial, 274, *275*

metabólitos, transporte, 1

metabolômica, 494-496
 análise do alvo metabólico, 495
 impressão digital metabólica, 495
 perfil metabólico, 495

metais pesados, 67-68

metais traço, 129, 300

metaloenzimas, 129

metalotioneína, 140, 141

metemalbumina, 37

metemoglobinemia adquirida (tóxica aguda), 54

metformina, 288

5-metil tetra-hidrofolato (n^5MeTHF), 136

metilcobalamina, 137

metionina, 8, 18
 e ácido fólico, 136

miastenia grave, 590

micelas, 122

microarranjo, hibridização, 464, *465*

micróbios, reconhecimento na resposta imune, 511

microglia, 570

micronutrientes, 2

microssomos, 14

microvilosidades, 116

mieloma múltiplo, 39

mielomatose, 39

minerais, 298-300
 perda de, na diarreia, 117

mioglobina (Mb)
 armazenamento de O_2 pela, 45-46
 curva de saturação de O_2 para, *46*
 e complexos ferro-enxofre, 104
 e ferro, 36

transporte de O_2 pela, 43, 44

miosina
polimerização, *256*
proteínas do sarcômero, 255-256

mitocôndria, 2, 14
ciclo do TCA localizado na, 174
e ciclo da ureia, 243
e citocromos, 106
e controle respiratório, 109
formação de superóxido pela, *501*
membrana interna, e sistema de transporte de elétrons, 100, *103*
transporte de ácidos graxos para, 185-186
β-oxidação da, 186

mitogênese, 597-598

modelo de mosaico-fluido, membranas biológicas, 30-31

modelo sequencial (multiestado), 70

modificação covalente, regulação por, 113-114

molécula de adesão de células vasculares-1 (VCAM-1), 229

moléculas de adesão, 517

moléculas de adesão da família de supergenes das imunoglobulinas, 517

moléculas, anfotéricas, 8

monensina, 88

mono aminoácidos, 8

monoacilgliceróis, 122

2-monoacilgliceróis (2-MAGS), 122, 123

monoamina oxidase (MAO), inibidor (MAOI), 586

monócitos, 229
transformação para macrófagos, 511

3′,5′-monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), 76

monofosfato de adenosina (AMP),
quinase estimulada por (AMPK), 100, 293-294

monofosfato de adenosina cíclico (cAMP)
e glucagon, 158
elementos de resposta (CRE), 450
metabolismo de, *556*
radioimunoensaio (RIA), 566
receptores β-adrenérgicos acoplados ao, 554-556

monômeros, 13, 118, 119-121

monossacarídeos, 118
formas isoméricas dos, 118
sistemas de transporte para, 121

monóxido de carbono (CO)
envenenamento, 46, 113
inibição pelo, 111-112

mortalidade, taxa humana de, *610*

mucinas, relação estrutura-função das, 355

mucopolissacaridoses, *386*

mucosa intestinal, na doença de Tangier, 224

mucoviscoidoses, 92

mudança no estilo de vida, e perfil lipídico plasmático, 234

mudanças epigenéticas, 486

multienzimas, 408

multigenes, 590-591

músculo
acoplamento excitação-contração, 258
gatilho de cálcio, 258-259
contração
alta potência, 259-260
ATP na, 259
baixa intensidade, 260
ciclo, movimento do Ca^{2+} na, *94*
curta duração, 259-260

longa duração, 260
modelo do filamento deslizante da, 257-258
processo de, 257-259
desempenho de longo prazo (estamina), 260-261
desenvolvimento do, 262
dor no, deficiência de biotina, 136
e insulina, 269
esquelético
rede tubular transversa, *258*
estamina, 260-261
estrutura, 254-257
fibras de baixo poder oxidante, 261
fibras rápidas glicolíticas, 261
glicogenólise no, 163-165
hierárquica, *254*
metabolismo energético, 253-263
proteínas desacopladoras, síntese, 111
regeneração do, 262
síndromes de desperdício, 261
transporte e mobilização de Ca^{2+} no, 93
unidade contrátil (sarcômero), 254-255

mutações
bases do câncer colorretal, 604
estudo através do sequenciamento, 485-486
no gene da proteína do canal de água, 88

mutarotase, 70

N

N^{10}-formiltetra-hidrofolato-poliglutamato, 136

N-acetilglicosamina (GlcNAc), 26, 351

N-acetilglutamato, 243

NAD *See* nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD)

NADH *See* nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADP *See* nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

náusea, deficiência de tiamina, 135

necessidade média estimada (EAR), 295

nefropatia, diabética, 287

neonatos
 deficiência de Cu em, 106
 hipocalcemia em, 345-346

neuroglobina (Ngb), e citoglobina, 52-53

neuromoduladores, neuropeptídios como, 591

neurônios
 características dos, 571
 e transporte axonal, 571
 estrutura funcional dos, *572*
 norepinefrina no CNS, *585*

neuropatia diabética, 284

neuropatia periférica, deficiência de tiamina, 135

neuropeptídios
 como neuromoduladores, 591
 famílias multigenes de, 590-591

neurotransmissão, 580-583
 desordens de, 585

neurotransmissores, 579-591
atividade sináptica, 581-582
baixo peso molecular, *580*
classes de, 583-93
classificação dos, 579-580
definição de, 579
e atividade dos canais iônicos, 581
liberação de, *581*
manipulação da concentração, 583
no sistema nervoso autônomo, *580*
regulação dos, 582-583
síntese de, *584*

neutrófilos, 512

niacina
deficiência, 135
e síntese de NAD+/NADP+, 135

nicotinamida, 89

nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), 2
como principal enzima redox, 100
fosfato (NADP), reduzida (NADPH), 151

nigericina, 88

ninidrina, 18

nistatina, 88

nitrogênio
e ciclo da ureia, 240-241
equilíbrio de, 245, 301
espécies reativas (RNS), 502
excreção de, *242*, 301
proveniente de aminoácidos, 392-393
quantificação de ureia no sangue, 239

nitroprussida, 191

nível superior tolerável de ingestão (UL), 296

N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor de glutamato, *583*

NO sintase endotelial (eNOS), 227

noradrenalina *See* norepinefrina

norepinefrina (noradrenalina), como neurotransmissor, 585-586

N-terminal, 11

N-terminal, e imunoglobulinas, 38

núcleo, 14

nucleossomos, 416

nucleotídios
biossíntese e degradação de, 403-412
classificação dos, *404*
fonte em linfócitos, 406
marcação de sondas, 462-467
metabolismo, 358-362
"de novo", regulação, 411
polimorfismo de base única (SNPs), 472
reciclagem, via de salvamento, 404
sequências, 450 *See also* purinas; *See also* pirimidinas

número de renovação (*turnover*), 63

nutrição, 1
avaliação, 300-301
consumo adequado (AI), 296
debate manteiga-margarina, 28
e balanço energético, 291-306
e ciclo de vida, 296
e doença crônica, 305
fatores determinantes do estado, *291*
ingestão alimentar de referência (DRI), 294-295
marcadores bioquímicos do estado, 301
nível superior tolerável de ingestão (UL), 296
pirâmide alimentar, *304*
requerimento médio estimado (EAR), 296
suporte para, *306*
testes laboratoriais, 301

nutrientes
concentração plasmática, influenciada por genótipos, 295-296
essenciais (limitantes), 298
funções dos, *296*
metais traço, 129, 300

principais classes de, 296-298

nutrigenômica, 1, 295-296

O

obesidade, 1, 202
 anormalidades na via de transporte de combustível, 225
 como problema de saúde, 303
 e artrite, 302
 e diabetes do tipo, 2, 281, 302
 e doença cardiovascular, 282
 e proteínas desacopladoras, 111
 múltiplos problemas da, 303

o-ftalaldeído, 18

oleato, *27*

óleos hidrogenados, 28

óleos naturais, 28

óleos vegetais, hidrogenação parcial dos, 28

oligodendrócitos, 570, 572

oligômeros, 118

oligomicina, 112

oligonucleotídios
 alelo-específico (ASOs), 472
 e hibridização por *dot-blot*, 472
 (micro)arranjos, 484-485

oligopeptídios, 124

oligossacarídeos
 alta manose, *353*, 361, 363
 cadeias glicoproteicas, 363-364
 e digestão de polissacarídeos, 121
 N-ligados, 353
 e dobramento de proteínas, 363
 e enzima complementar da célula, 356
 modificações finais, 362
 processamento a partir da alta manose para formas complexas, *361*
 síntese de, *361*

O-ligados, *354*, 362

omental, doença de Cushing de, 540

omeprazol, 95

oncogenes, 593
definição, 593
dominância de, 606
identificação de, 604-605
transdutores de sinal mutantes, 604-606

órgãos endócrinos
não clássicos, 526
tecido adiposo como, 201-203

ornitina transcarbamoilase, 244

osmolalidade, 309-312
diferenças na, 310
e rins, 312
e volume de ECF e ICF, 312
na digestão, 120

osso
reabsorção
fatores que afetam, *338*
remodelamento, 337
ciclo, *338*
renovação (*turnover*) acelerada, 347

osteoclastos
como células de reabsorção óssea, 337-338, 347
controle dos, 338-339
diferenciação, maturação e regulação dos, 338
inibição da reabsorção óssea, 343

osteogenesis imperfecta (OI), 12

osteomalácia, e deficiência de vitamina D, 348

osteopetrose, 92

osteoporose, 347, 348
fatores de risco e causas secundárias, *347*

ovário

ações do FSH e LH nos, 543-544
desordens do, 544

ovoalbumina, 68

oxaloacetato, 246

oxidação
combustível, estágios de, 98
como fonte de energia, 97-98

óxido nítrico (NO)
como neurotransmissor, 588
e vasodilatação, 76, 227
gerado na parede de vasos, 75-76
interações com a hemoglobina, 52
sintase, 7

óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), 76

oxidorredutases, 61, 62
e riboflavina, 135

oxidosqualeno ciclase, 208

oxigênio, 2
a não reatividade do, 499-500
consumo de
pela mitocôndria, *109*
e vida, 499-507
em reações de desnaturação, 199-200
espécies reativas de (ROS)
defesas enzimáticas contra, *505*
e estresse oxidativo, 500-501
e proteínas de desacoplamento, 111
efeitos benéficos das, 505-506
estrutura das, *499*
fármacos, 153
resposta celular às, 504
estrutura do, *499*
natureza do dano do radical504
para envenenamento por monóxido de carbono, 113
pressão parcial de (pO_2), *329*
propriedades do, 43
tensão de, 1
terapia hiperbárica, 46

oximetria de pulso (*pulse-ox*), 49

P

p53, regulação do ciclo celular pela, 607

palmitato, 27, 199
 β-oxidação do, 187
 produção de energia, *188*

palmitoil-CoA, 195, 196

pâncreas, 122
 ação na digestão, 68
 câncer de, 402
 células β do, 111
 digestão proteica, 125
 doença no, 117
 enzimas, 60
 secreções, 116

pancreatite, 68, 122

paracetamol *See* acetamifen (paracetamol)

parede de vaso, prostaciclina e óxido nítrico gerados na, 75-76

parede vascular
 alterações estruturais, 230-231
 e proteoglicanas, 388
 inflamação na, 227-228

paredes dos vasos sanguíneos
 adventícia, 75
 endotelial, 75
 geração de óxido nítrico nas, 75
 geração de prostaciclina nas, 75
 média, 75
 vasoconstrição, 75

patologias endócrinas, principais tipos de, 529-531

PCR em tempo real (RT-PCR), 478-479

p-cresol, 109

pedras vesiculares, colesterol, 212

pelagra, 135

pele, alteração na deficiência de cobre, 141

peneira molecular, 15-16

penicilamina, 92

penicilina, 36

pentaclorofenol, 109

pepsina, 121, 125, 238

pepsinogênio, 117, 121

peptidases
 e pâncreas, 122
 hidrólise de proteínas, 124

peptídeo natriurético cerebral (BNP), 319

peptidil transferase, 441

peptídios, *2*
 clivagem de ligações, 126
 como neurotransmissores, 590
 digestão de, 126
 e leucócitos, 33
 e proteínas, 11-14
 natriuréticos
 marcadores de falência cardíaca, 320

peptídios natriuréticos, 320

perda de apetite, deficiência de tiamina, 135

peristalse, 115

peso corporal e BMI, 300

peso, perda de, e falência renal, 301

pH (concentração de íon hidrogênio), 1, 8-11, 17
 e sistemas de tamponamento, 326

efeito do, 60
gradiente, 16, 17

pinocitose, 36

pirâmide alimentar, Departamento de Agricultura dos EUA, *304*

pirano, 24

piranose, *25*

pirexia, 140

piridoxal
fosfato, 588
papel catalítico da, *239*

piridoxina
e consumo alto de proteína, 135-136
no metabolismo de aminoácidos, 135

pirimidinas, 403
anel de, 403-404
metabolismo das, 408-409
síntese, *409.*, *410*
vias de salvamento de, 408-409

piruvato, 2
carboxilase, 175
complexo desidrogenase, 175-176, *177*
ácido lipoico na, *177*
deficiência no, 176
regulação da, *180*
conversão para metabólitos, 175
e glicólise, 143
e lançadeira de malato, 198
metabolismo, na via cruzada das, *175*
quinase (PK), 147, 149
deficiência, 150

placas ateroscleróticas, crescimento e ruptura das, 232

placenta, e imunoglobulinas, 39

plaquetas
adesão, 77
agregação, 77

alterações na forma das, 77
ativação
e hemostasia, 73
vias de, *78*
e distúrbios de sangramento, 76-77
liberação de compostos pelas, 77
produção de tromboxano A2, 75, 76
receptores de membrana, 77

plasma, 1, 41
concentração anormal de proteínas produzidas pelo fígado no, 392
concentração proteica, 310
diminuição do volume na desidratação, 322
e lipídios, 26, 28
filtração, 312-313
lipoproteínas, 219-220
movimento da água, 310
perfil lipídico, alteração do estilo de vida e, 234

plasmalógenos, síntese, 188

plasmídeos
bacterianos, uso como vetores, 468
formação de, *468*
genes de resistência a antibióticos, 468
sistema de seleção recombinante, 468
sítio de clonagem múltiplo, 468

plasminogênio, similaridades com a lipoproteína (a), 221

Plasmodium falciparum, 55

plugues hemostáticos, 73, 74, 78

plugues plaqueta-fibrina, 73, 75

pólen, 29

poliacrilamida
eletroforese em gel (PAGE), 16, 17
eletroforese em gel, bidimensional (2D-PAGE), 18, 20

poliamidas, 5

poliaminas, 599

poliânions, 40

poli-hidroxi-aldeído, 23

poli-hidroxi-cetona, 23

polimerases do ácido ribonucleico, 426
 I (RNAPol I), 426
 II (RNAPol II), 426
 III (RNAPol III), 426

polimerização, 39
 miosina, *256*

polímeros, *23.*, *119*

polímeros alimentares, digestão dos, *119*

polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP), 474-475

polimorfismo de base única (SNPs), 472, 486

polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs), 471-472
 na anemia de células falciformes, 473

polipeptídios, 17
 estrutura dos aminoácidos, 5

polipose adenomatosa familiar (PAF), 607

polissacarídeos
 clivagem de, 118, *119*
 digestão de, 118, 121
 e açúcares, 26
 e resposta na fase aguda, 40
 estruturas dos, *27*

poliúria, 89

pontes dissulfeto, 8, 13, 17

ponto isoelétrico (pI), 10, 11, 17

porfirias, síntese defectiva do heme, 394

poros
 mitocondriais, 91

nucleares, 91
transporte através de, 90-91

possibilidade de pareamento de bases códon-anticódon, hipótese do equilíbrio da, 438

potássio
como principal mineral, 298-299
distribuição de, *307*
equilíbrio de
afetado pela cetoacidose diabética, 285
gradiente de, 308-309
perda de, na diarreia, 117
perda de, por êmese, 117

potenciais de ação, 580-581

potenciais de membrana, 1, 581

potencial de membrana mitocondrial (MMP), 110

pralina, 8

pré-calicreína, 79

pregnenolona, 216

pressão parcial (pO_2), de gases, *329*, *330*

pressão sanguínea, e angiotensina, 11

prinquinona, 153

príons, 20

procarboxipeptidases, 68

procariotos, 425
terminação da transcrição, *429*

pró-colágenos, 380-381

prodinorfina, 591

produtos finais da glicosilação avançada (AGE)
biomarcadores de estresse oxidante e envelhecimento, 615
e diabetes, 283
estrutura dos, *613*

produtos finais da lipoxidação avançada (ALE)
biomarcadores do estresse oxidante e envelhecimento, 615
estrutura dos, *613*

proelastase, 68

proencefalina A, 591

proenzimas, 68

progerias, 613

progesterona, no ciclo menstrual, 544

projeções de Fischer, *24*, *25*

projeções de Haworth, *25*

Projeto Genoma Humano (HPG), 458, 482

prolactina
desordens clínicas de secreção, 547-548
eixos, 547-548
inibida pela dopamina, 547

prolina
como α-aminoácido, 5, 8
e estrutura primária das proteínas, 18
e folha β-plissada, 12

promotores
acentuadores (*enhancers*), 450
acesso, 454
pró-carióticos, *427*

pró-opiomelanocortina (POMC), 591

pró-peptídios, BNP, 319

propionil-CoA, metabolizado a succinil-CoA, 188, *189*

prostaciclinas
geradas nas paredes dos vasos, 75-76
mediação da vasoconstrição/vasodilatação, 76
precursores das, 564-565

prostaglandinas

e aterogênese, 231-232
na inflamação, 67
precursores das, 564-565
síntese, 67, 565-566

proteases
pancreáticas, 122, 126
serina, 70
V8, 18

proteína ativadora de clivagem (SCAP) de SREBP, 210

proteína Bence-Jones, 39

proteína citosólica de ligação ao retinol (CRBP), 130

proteína cobalâmica, 139

proteína C-reativa (CRP)
e aterogênese, 229
e resposta na fase aguda, 40-41

proteína de ligação ao ácido retinoico (RABP), 130

proteína de ligação ao retinol (RBP), 130

proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), *225*

proteína de transferência de triglicerídeos microssomal (MTP), 222

proteína dissulfeto isomerase, 20

proteína Niemann-Pick C1 tipo 1 (NPC1L1), 206

proteína quinase A (PKA)
dependente de cAMP, 160
e glucagon, 158
e o cassete de sinalização ao cAMP, 556, *557*
fosforilação pela, 556
ligação ao cAMP, 556
regulação da fosforilação oxidante, 113

proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), cascata de sinalização, 598

proteína quinase C (PKC)
ativação de DAG da, 561
e câncer, 563

superfamília, *561*

proteína relacionada ao hormônio da paratireoide (PTHrP), 342
síntese, estrutura e relações, *345*

proteína supressora de tumor p53, 607

proteína tirosina quinase (PTK)
importância da, 595
papel na transdução de sinal, 595

proteínas, 1, 5-21
alto consumo, e piridoxina, 135-136
aminoácidos-açúcares anexados as, 351-353
análise estrutural das, 17-21
C, 82-83
carboidratos ligados a, 23
carreadores, 208, 527-528
chaperona, 20
"choque térmico" (*heat shock*), 20
clonagem celular de, 469
coagulação, 40
colágenos como, na MEC, 377
C-reativas (CRP) *See* proteína C reativa (CRP)
cromatografia de gel filtração de, 15-16
da dieta, 238-239
degradação pelo sistema ubiquitina-proteossomo, 392
destino celular das, 442
determinação da estrutura tridimensional, 20-21
determinação da pureza por eletroforese, 16-17
determinação do peso molecular por eletroforese, 16-17
diálise e ultrafiltração de, 15
digestão e absorção de, 118, 124-126, 238
diméricas, estrutura das, *13*
dímeros de proteínas covalente, 8, 13
dobramento de, 8, 20, 441
doença, 20
e oligossacarídeos *N*-ligados, 363
domínios de, 13
e glicose, 24
e peptídios, 11-14
endógenas, 237-239
estabilidade das, 363
estratégia para purificação de, 18
estrutura primária das, 11, 18-20

estrutura quaternária nas, 13-14
estrutura secundária das, 11-12
estrutura terciária das, 13
fase aguda, 391-392
fracionamento pela carga, 16
fracionamento por tamanho, 15-16
glutationilação de, 506
grupos ionizados nas, 9
hidrolisadas por peptidases, 124
identificação por HPLC-ESI-MS/MS, 20
íons metálicos como componentes das, 140
lipídios ligados a, 23
massa molecular das, 11
membrana, 30
metabolismo das, 237-239
 no fígado, 391-393
modificações pós-traducionais (PTMs) das, 14, 442-445, 490
moléculas funcionais das, 2
multiméricas, 13
na comida, 115, 297
perda e edema, 312
plasmáticas *See* proteínas plasmáticas
produzidas pelo fígado, concentrações anormais, 392
purificação de, 16
purificação e caracterização de, 17
recombinante, 1
relacionadas ao hormônio da paratireoide (PTHrP), 342
 síntese, estrutura e relações, *345*
renovação (*turnover*) de, 239
S, 82-83
separação baseada na carga das, 16-17
separação baseada no tamanho, 15
síntese, 2, 435-445
 alongamento, 439-440
 alvo, 442-443
 fidelidade da tradução, 437
 iniciação da, 439
 maquinaria da, 436-439
 modificações pós-transducionais, 442-443
 nos polissomos, *443*
 peptidil transferase, 441
 processo de, 439-440
 terminação da, 440, *442*
solubilidade das, 363
solubilidade e estabilidade das, 11

subunidades das, 13
tampão, 327
transferência, 222
transferência, e metabolismo lipoproteico, 222
transporte, de íons metálicos pelas, 36-37
triméricas, 13
ultrafiltração de, 15
valores de p*K*a das, 9

proteínas carreadoras, 208, 527-528

proteínas da coagulação, 40

proteínas de ligação ao elemento regulador de esteroides (SREBPs), 223

proteínas desacopladoras (UPC), 109-111

proteínas do complemento, 40

proteínas G, 160
ativação da adenilato ciclase, 556
como interruptores moleculares, 554
e receptores sensíveis ao cálcio, 340
glucagon, mecanismo de ação, 158
mecanismo de sinalização das, 553-554
propriedades das, *555*
receptores metabotrópicos acoplados às, 582
subunidades das, *555*
toxinas bacterianas de, 555

proteínas plasmáticas, 34-40
sintetizadas no fígado, 391

proteínas recombinantes, 1

proteínas transmembrana, 30

proteinúria, 35, 89

proteoglicanos, 2
estrutura das, *352*
funções das, 386-388
síntese e degradação das, 385-386

proteólise, 39

proteoma, 18

estudos de, 481-482

proteômica, 2, 5
definição, 18, 490
desafios da, 490-491
espingarda, 494, *495*
na medicina, 491
principais métodos na, 491-494

proteossomas
e renovação (*turnover*) de proteínas, 443-445
estrutura dos, *444*

prótons
bombeamento de, 102, 105
e síntese de ATP, 92
transporte por *uncouplers*, *110*

proto-oncogenes, 593

pró-trombina, 40, 132, 133

pseudo-hipoparatireoidismo, 346

pseudoxantoma elástico, 92

psicose de Wernicke-Korsakoff, 135

puberdade, precoce, 544

pulmões
acidose respiratória, 329
câncer de, 139
e equilíbrio ácido base, 325
e regulação da taxa respiratória, *329*
perfusão, 330
transporte de CO_2 para, 330
troca gasosa, 327-330
ventilação, 330

purinas, 403
degradação das, *407*
metabolismo de, 403-408
nomes e estruturas das, *404*
síntese de novo do anel de, 403-404

Q

queratan sulfato, 385

querníctero, 36

quilomícrons, 124, 205
 transporte de lipídios pelos, 222

quimiocinas, 511

quimioterapia, novas abordagens para, 455

quimotripsina, 60, 125
 mecanismo de ação da, *65*

quimotripsinogênio, 68

quinases, celulares, 69

R

radiação ultravioleta (UV), 340

radicais hidroxil, danos às biomoléculas, 502, *504*

radioimunoensaio (RIA), do cAMP, 566

radioterapia, aplicações das ROS, 501

ratos
 termogênese nos, 111
 veneno para rato, 133

reação de Benedict, 26

reação de combustão, baixa temperatura, 1

reação de Fenton, *501*

reação de Harber-Weiss, 501

reação de Maillard, 284

reação em cadeia da polimerase (PCR), *485*
 alongamento, 471
 amplificação de DNA, 468, *470*
 anelamento, 470
 aplicações da, *470*
 desnaturação, 470
 detecção de mutações, 474
 detecção de repetições microssatélites
 trinucleotídeos instáveis, *475*
 polimorfismo de base única (SNPs), 472, 486
 regiões que flanqueiam a sequência-alvo, conhecimento prévio, 471
 sistema de amplificação refratário a mutação (ARMS), 474
 tecnologia, 2
 tempo real, 478-479
 transcriptase reversa, 478
 vantagens e desvantagens da, 471

reações anapleróticas, 183-184

reações de hidroxilação, 215

reações de oxidorredução, 62

reações de transferência de carbono, 136

reações enzimáticas
coenzimas, papel das, 62
efeito da temperatura, 59
fatores que afetam, 59-60
perfil da reação, *59*

reações redox, complexos ferro-enxofre nas, 104

reagente de Edman, 18

reagente tiol, 17

rearranjo de Amadori, 283

receptor ativador para o fator nuclear (RANK), 338-339
ligante (RANKL), 338

receptor Gpr54, 540

receptor RANK
controle dos osteoclastos, 338-339
diferenciação, maturação e regulação dos osteoclastos, 338

receptores
ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARS), 224
catecolaminas, 589
celular, 220-221
de esteroides *See* hormônios esteroides, receptores; *See also* receptores de esteroides
de hormônio polipeptídico, 553
glicoproteína, 77
glutamato NMDA, *583*
hormônio, 551-553
intracelulares, 551-552
iontrópicos, 582
lipoproteína, LDL, 210, *354*
lipoproteínas, 221-222
manose, 512
metabotrópico, 582
nicotínico, 587-588
nucleares, 210-211, 216
PDGF, *595*
proteína G

e sensíveis ao cálcio, 340
Gpr54, 540
RANK, 338-339
reconhecimento de antígeno, 512
removedores (*scavenger)*, 221-222, 512
sensíveis ao cálcio (CaSR), 340
superfície celular, 553
X, na síntese e secreção da bile, 213

receptores farnesil X (FXR), 213

receptores adrenérgicos *162*, 559, 574

receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs)
e fibratos, 234-235
e vitamina A, 130
papel regulatório do, 224, 272, *273*

receptores celulares, 220-221

receptores de esteroides, 452-453
família gênica, 453
organização da molécula, 453
similaridades entre, *454*

receptores de membrana, 77
classificação dos, *552*
e transdução de sinal, 551-567

receptores nicotínicos, ionotrópicos, 587-588

receptores nucleares, 210-211, 216

receptores para ácido retinoico (RAR), 130

receptores para retinoides x (RXR), 130

receptores removedores (*scavengers*), 221-222, 512

receptores X, e síntese/secreção de bile, 213

redução de peso, 304-305

refeição, 2

reflexo esofágico, 115

região hidrofóbica, 122

regulação homotrópica, *69*

relação de atividade física, 108-109

relação P:O, 108-109

remendos da membrana, 31

repetições de trinucleotídios, e doenças humanas, 476

repetições microssatélites, e estudos de herança, 475

resgate de células mediado pelo fator de crescimento, *601*

resíduos de aldeído, 24

respiração, 1, 2

resposta de luta ou fuga, 161

resposta imune
 adaptativa (adquirida/específica)
 linfócitos na, 513
 memória imunológica na, 512, 517
 reconhecimento de antígeno, 512
 resumo da, *522*
 tempo de desenvolvimento para, 512
 complexo principal de histocompatibilidade (MHC), 514-515
 e vacinação, 520-523
 educação tímica na, 512
 humoral específica, 519-520
 inata (não específica), 509-513
 células da, 511-512
 mediadores inflamatórios na, 509
 sistema complemento, 509-510

resposta imune humoral específica, 519-520

resposta na fase aguda, 40-41

restrição calórica, e longevidade, 617-618

retículo endoplasmático, 14
 e citocromos, 106
 montagem/processamento de oligossacarídios, *361*

síntese de proteínas no, *443*

reticulócitos, eritrócitos, formação, *34*

retinal, 129

retinoblastoma, gene (Rb), 606-607

retinoides, 552

retinol, 129

riboflavina, e oxidorredutases, 135

ribonucleotídio redutase, 409, 411

ribose, *26*

ribossomos, e eritrócitos, formação, *34*

ribozimas, 430

ribulose-5-fosfato, 152

ricina, toxicidade da, 365

rins
danos aos, 110
e equilíbrio acidobase, 312, 325
filtração glomerular
taxa (GFR) *See* taxa de filtração glomerular (GFR)
manipulação do bicarbonato nos, 330-335
manutenção do ECF pelos, 312
néfrons, 312
oxigênio utilizado pelos, 312
proteoglicanas nos, 387
transporte de glicose nos, 94
túbulos *See* túbulos renais

risco cardiovascular, avaliação do, 232-234

RNA *See* ácido ribonucleico (RNA)

rodopsina, 575

rotenona, 111

S

sabão, 28

sais biliares, 31, 122

sal
 diálise e ultracentrifugação, 15
 pontes, 13
 soluções alcalinas de sal cúprico, 26

salicilatos, 36

saliva, 116

salting in, 14

salting out, 14-15

sangue, 1, 14
 coágulo, 68, 69
 coagulação, 1
 inibidores, sítios de ação, *82*
 via extrínseca, 79-80
 via intrínseca, 79
 elementos formadores do, 33-34, 41
 equilíbrio acidobase no, 11
 gases, valores de referência para, 328
 grupos de substâncias, 374-376
 lipídios, 1 *See also* lipídios
 nitrogênio na ureia, medição do, 239
 oculto, detecção pela peroxidase de, 506
 soro, 33

saponificação, 28

sarcômero
 estrutura dos, 254-255
 filamentos grossos e finos dos, 255, *256*
 proteínas do, 255-257

sarcopenia, 253

scrapie, 20

secreções exócrinas, pâncreas, 122

secretina, 122

selectinas, 517

selênio, 140
 ocorrência celular de, 141

selenocisteína, 141, 250

selenometionina, 141

série Bio-Gel P®, 16

série Sephadex®, 16

série Sepharose®, 16

serina, 7, 13, 18
 e ácido fólico, 136
 e fosfolipídios, 28
 protease
 sítios de ligação ao substrato da, *60*
 tríade catalítica da, 65

serina proteases, 70

serotonina
 como neurotransmissores, 586-587
 desordens do metabolismo, 589
 e endotélio normal, 75
 receptores múltiplos para, 589

sinalização
 ácidos graxos, 297
 cascatas de, 268, 272, 338-339, *558*
 mecanismos independentes de receptores, 553
 receptor acoplado, 553-554
 receptor PDGF, *595*, 596

sinalização celular, 5, 595

sinapses, tipos de, 573

síndrome AFLP, em mães de crianças nascidas com LCHAD, 192

síndrome carcinoide, 590

síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS), 369

síndrome da realimentação, 302-303

síndrome de Bernard-Soulier, 77

síndrome de Bloom, 613

síndrome de Conn, 318

síndrome de Cushing, 538
 medição de esteroides, 214
 mobilização lipídica, 191

síndrome de Dubin-Johnson, 92

síndrome de Ehlers-Danlos, 12, 76

síndrome de Guillain-Barré, 569

síndrome de Hutchinson-Gilford, 613

síndrome de Marfan, 13, 381

síndrome de McCune-Albright, 566

síndrome de Prader-Willi (PWS), 465

síndrome de Werner, 613

síndrome de Zellweger, 92, 188

síndrome do restaurante chinês, 239

síndrome HELLP, em mães de crianças nascidas com LCHAD, 192

síndrome metabólica, 41, 282

síndrome nefrótica, 35

síndrome Smith-Lemli-Opitz, 209

síndromes da imunodeficiência combinada grave (SCIDS), 412

sintases, 61

sintetases, 62

sistema canabinoide endógeno, 292

sistema circulatório, envelhecimento do, 615

sistema complemento
 ativação do, *510*,, *521*
 cascata, *510*

sistema de amplificação em cascata, para o glicogênio, *159*

sistema fibrinolítico, *84*
 propriedades dos componentes, *83*

sistema imune, 1
 falha do, *523*

sistema JAK-STAT, *597*

sistema límbico, *583*

sistema linfático, 124

sistema nervoso, células do, 570-572 *See also* sistema nervoso central (CNS)

sistema nervoso central (CNS), 571
 células do, 570-572
 defeitos, 209
 e metabolismo ósseo, 348
 ferro no, 571
 imunologia regional, 571
 parênquima cerebral do, 570

sistema nervoso parassimpático, 116

sistema nervoso simpático, 599

sistema pró-oxidante, *500*

sistema regulatório hipotálamo-pituitária, 531-532

sistema regulatório hipotálamo-pituitária anterior, 532

sistema renina-angiotensina, *318*

sistema renina-angiotensina-aldosterona, e falência cardíaca, 320

sistemas antioxidantes, *500*

sistemas de equilíbrio acidobase, 10, 11

sistemas de tamponamento corporais, 325-327

sistemas de tamponamento do corpo, 325-326

sistemas sensitivos, transdução de sinal, 553

sitosterolemia, 92

slg *See* imunoglobulinas, superfície

sobrevivência, humana, 610

sódio
 bomba de, *309*
 como principal mineral, 298
 defeitos no canal de, 574
 distribuição do, *307*
 dodecil sulfato (SDS), 16, 17
 e homeostasia da água, 322-323
 gradiente de, 308-309
 hidróxido de (NaOH), 10-11, 28
 metabolismo, e água, *322*
 perda de, na diarreia, 117
 reabsorção de
 nos túbulos renais, *315*

soluções alcalinas de sal cúprico, 26

somatostatina, e secreção de GH, 545

sono, 155

sorbitol, 26

soro
 e plasma, 33
 sódio, em desordens fluídicas e eletrolíticas, 322
 ureia, 316, 319

Streptococcus mutans/lactobacillus, 148

substrato suicida, 177

succinato desidrogenase, 181-182

succinato-Q redutase, 103

succinil-CoA
 e ciclo do TCA, 173, 183
 e propionil-CoA, 188, *189*
 sintetase, 181

suco gástrico, 95-96

sucrose, *27*
 na digestão, 118

sulfato de amônio, fracionamento, 14-15

sulfato de condroitina, 384

sulfato de heparina, 385

sulfidril
 e glutationa, 11
 e ovoalbumina, 68

sulfonamidas, 36

sulfonilureias, 288

superóxido
 dismutase (SOD), Cu, Zn, 13
 formação pela mitocôndria, *501*

suporte nutricional, *306*

surdez, 91

surfactantes, 122, 369

T

tabagismo, 139

β-talassemia, 53

talassemias, 53

tampões, 10-11
 bicarbonato, 326-327
 intracelular, 327

tampões intracelulares
 fosfato, 327
 proteína, 327

taxa de filtração glomerular (GFR), 322
 estimada (EGFR), 316

taxa de sedimentação de eritrócitos (ESR), 41

taxa metabólica basal (BMR), 97-98

tecido adiposo, 26
 atividade endócrina do, *293*
 citocinas hormonalmente ativas e pró-inflamatórias, 293
 como órgão endócrino, 201, 292-294
 e triglicerídios, 28
 marrom, 109-110

tecidos linfoides
 associados à mucosa (MALT), 516
 primários (central), 515-516
 secundários (periférico), 516

tecidos
 funções especializadas dos, 2
 troca de informações entre, 1
 vitaminas lipossolúveis armazenadas nos, 129

tecnologia genética, recombinante, 84

telômeros, 416
 idade e capacidade de replicação, 616

tempo de coagulação do caolin-cefalina (KCCT), 79

tempo de pró-trombina (PT), 78, 81

tempo de trombina, 81

tempo de tromboplastina parcialmente ativada (APTT), 79

tendões, 13

teofilina, 161

terapia anticoagulante, 78

terapia com AZT para infecção pelo HIV, 419

terapia de reposição hormonal (HRT), 545

terapia genética, 559

terapia hiperbárica, 46

teratogenicidade, 139

terminal carboxil, 11

termogênese, 111

teste Papanicolau (*Pap smear*), 604

testes endócrinos, provocativos, *530*

testes, FSH e LH, ação nos, 541

testosterona
 ações bioquímicas em homens, 541
 deficiência de, 541, 542
 desordens clínicas em homens, 541, 542
 mecanismo de ação da, *543*

tetraedro (Hb), 46

tetra-hidrofolato, 136

tiamina
 deficiência, 135
 e alcoolismo, 135
 e carboxilação, 134-135

e ciclo do TCA, 176
e consumo calórico, 135

tiazolidenedionas, 288

timidilato sintase, 411

timidina
trifosfato de (TTP)
via única da, 409-411

timidina quinase (TK), 69

timina, dímero de, *420*

timo
desenvolvimento de células T no, 516
linfócitos no, 33, 516

tioquinase, *185*

tiossulfato, 113

tiras de reagentes, 70

tireoide
função, desordens clínicas da, 531
hormônios da
ações bioquímicas dos, 535
mecanismo de biossíntese dos, *534*

tirosina, 6-7, 13
degradação da, 138
fosforilação, 165
transporte de O_2, 44

tiroxina, e tri-iodotironina, 533-535

titulação, de aminoácidos, 8, *10*

tocoferóis, *132*

tonsilas, na doença de Tangier, 224

toxinas bacterianas, sítios de ligação para, 375

traços hereditários, alterações epigenéticas, 486

tradução
alongamento, 427-428
nick, 483

transaldolase, 152

transaminação, 239

transaminases, 399

transcetolase, 134-135, 152

transcobalamina (TC), 139

transcrição, terminação em procariotos, *429*

transcriptoma, estudos de, 481-482

transcriptômica, 487-488

transdução de sinais, 1

transdução de sinal, 1
acoplamento de receptores para, 553-554
e receptores da membrana, 551-567

transferases, 61

transferrina
e ferro, 36
e resposta na fase aguda, 40

translocases
ADP-ATP, inibidores de, 112
ATP-ADP, 92

transmissão adrenérgica, 574-575

transmissão colinérgica, 573-574

transmissão sináptica, 572-575
e reciclagem de componentes da membrana, 573

transportadores
cassete de ligação ao ATP (ABC), 92
dependente de sódio, 121
glicose (uniporteres), 90

classificação dos, *90*
GLUT-1, 89, 90, 144
GLUT-2, 90, 156, 157, 267
GLUT-4, 90, 165, 169, 269
GLUT-5, *95*, 121
independentes de sódio, 121

transporte
ativo, 119-121
através de canais e poros, 90-91
exemplos de sistema e acoplamento, 93-96
mecanismo antiporte (contratransporte), 93
mecanismo simporte (cotransporte), 93
mecanismo uniporte (monoporte), 93
mediado por proteínas da membrana, 88-90
passivo, 119-121
sistemas, saturabilidade e especificidade dos, 89
tipos de processos, 87-89

transporte de elétrons, 2, 101-104
inibidores, 111-112

transporte íônico1, 30

transtiretina, e resposta na fase aguda, 40

trato gastrointestinal (GI), *116*
características do, 115
entrada de carboidratos, 118
entrada de comida no, 115
enzimas digestórias no, 117
função do, 115
má digestão, 117
organização por requerimentos funcionais, *117*
sangramento no, 141
secreções, 117

trealose, na digestão, 118

treonina
dobramento da cadeia peptídica, 13
estrutura proteica, análise, 18
transporte de O_2, 44

triacilgliceróis (TAG)
ácidos graxos, armazenamento, 201, 265-266

e absorção lipídica, 123
e pâncreas, 122
síntese de, 124, 200-201
transporte de, 219
pelo VLDL, 222-223

tríade catalítica aspartato-histidina-serina, 65

tríades catalíticas, modelo esquemático de, *65*

trifosfato de adenosina (ATP)
acoplamento, 99
biossíntese dirigida por, 99
bombeamento, 91-93
cassete de ligação, 206
complexo sintase, *108*
conservação de energia pelo acoplamento com, 99
e arsenato, 148
e contração muscular, 259
e deficiência de cobre, 106
e magnésio, 101
e plaquetas, 77
e transporte ativo, 91
função metabólica, 97
mecanismo de alteração da ligação da ATP sintase, *108*
sintase, 112
síntese de, 107-111, 404
síntese de ácidos graxos, 195
síntese mitocondrial do, a partir de coenzimas reduzidas, 99-101
transportador de cobre tipo P (ATP7B), 37

trifosfato de adenosina sintase *See* ATPase

trifosfato de guanosina (GTP), 158

triglicerídios, 1, 28
armazenamento de, 23, 265-266
e ácidos graxos ômega-3, 235
e lipídios, 26
na manteiga, 28

trinitrotolueno (TNT), 110

trioses, açúcares como, 23

tripanossomos, antígenos de superfície variáveis de, 370

tripeptídios, 11

tripsina
 atividade enzimática, 60, 65
 digestão proteica, 125, 126
 proteínas, estrutura primária, 18
 sítios de ligação de substrato da, *60*

tripsinogênio, 68, 125

triptofano
 e aminoácidos, 6, 7, 13, 18, 247
 estrutura proteica, análise da, 17-18
 síntese de niacina a partir do, 89
 transporte de O_2, 44

troca de ânion, 16

troca de cátions, 16, *18*

troca gasosa, 1
 nos pulmões, 329-330

trombastenia de Glanzmann, 77

trombina
 ciclo de retroalimentação (*feedback*) do, 81
 e plasma, 33
 formação excessiva, prevenção da, 81-83
 na cascata de coagulação sanguínea, 33
 papel na hemostasia, 74, 81

trombocitopenia, 77

trombócitos (plaquetas), 34

tromboembolismo, 78

tromboplastina, 33

trombose venosa profunda (DVT), 83

trombose
 arterial, 73, 76
 prevenção da, 81-83
 venosa, 73

tromboxano
A2 (TXA2)
produção pelas plaquetas, 75, 76
receptor antagonista, 77

tromboxanos, precursores dos, 564-565

tropocolágeno, 12

tropomiosina, 256-257

troponinas, 256-257
cardíaca, quantificação da, 262

túbulos renais
absorção de bicarbonato nos, 330
e proteínas Bence-Jones nos, 39
multiplicação e troca em contracorrente nos, *314*
reabsorção de sódio nos, *315*

tumores
apoptose na formação, 602
pituitários, 547
secundários *ver* metástase

U

ubiquinona
citocromo c redutase (complexo III), transferência de elétrons para, 104
sistema de transporte de elétron mitocondrial, 101

ubiquitina, proteínas intracelulares marcadas para degradação proteossomal, 392

úlceras
duodenais, 76
estomacais, 121

ultracentrifugação, 14, 220

ultrafiltração, 15

unidades transcricionais, 451

uniporteres, 90, 93

ureia, 13, 30
níveis sorológicos de, 316, *319*
síntese de, *243*

uridina, difosfato glicose (UDP-Glc), 358

urina, 7, 313-315
análise, 315
com odor de xarope de bordo, 250
corpos cetônicos na, 191
de coloração escura, 153
diluição, avaliação, 261
e vasopressina, 320
excreção de cálcio, 343
excreção de etilenoglicol, 66
excreção de hormônio esteroide, 216
excreção de metanol, 66
excreção e balanço de nitrogênio, 301
proteínas de Bence-Jones na, 39
vitaminas solúveis em água excretadas na, 134

V

vacinação, e resposta imune específica, 520-523

valina, 6

valinomicina, 88

valores de pK_3, aminoácidos, 8-9

vasoconstrição, e hemostasia, 73

vasodilatação, causada pelo NO, 76, 227

vasopressina
 controle do sódio renal, 322
 e aquaporinas, 320
 e controle de água, 322
 e desordens de secreção, 320
 urina, volume final e concentração, 320

vazamento endotelial, 52

vegans, e deficiência de vitamina B_{12}, 137

veneno, inseto, 29

verapamil, 5

vesícula biliar, 122

vesículas sinápticas, 599

vetores virais, 1, 469

via alternativa, 39

via anabólica, *265*

via da pentose fosfato, 143, 150-153
 etapa de interconversão da, 151-152
 etapa redox da, 151
 função na RBC, 152-153
 reações de equilíbrio na, *153*

via de extravasamento, *223*., 226

via de novo, 408

via de transporte de combustível
 anormalidades, 225-226
 metabolismo lipoproteico, 222-223

via do poliol, e complicações diabéticas, 283-284

via extrínseca, na coagulação, 79-80

via intrínseca, da coagulação, 79

via lisossomal, para GM_1, *373*

via metabólicas, enzimas, regulação por hormônios, 272

vias catabólicas, 173-174, 265

vírus da imunodeficiência humana (HIV), infecção, terapia com AZT para, 419

vírus da *varicela-zoster* (VZV), 69

vírus herpes simples (HSV), 69

visão
 embaçada, 575
 mecanismo de, 575-576

vitamina A, 129-130
 armazenamento no fígado, 130
 estrutura, metabolismo e função, *130*
 fontes de, 130

vitamina B_1 *See also* tiamina

vitamina B_{12}
 deficiência, 136, 137
 digestão, absorção e transporte de, *138*
 e estrutura heme, 137
 e folato, 137
 necessidade de suplementos, 137-138
 proteínas de transporte, 139 *See also* cobalamina

vitamina C
 como agente redutor, 138

deficiência, 76, 138-139
e antimicina A, 111
estrutura e síntese de, *139* *See also* ácido ascórbico

vitamina D
consumo na dieta, pobre, 347
estrutura, função e metabolismo da, *132*
luz do sol, exposição reduzida à, 347
má absorção do, 347
metabolismo, *342*
anormal, 347
metabólito ativo da, 342-343
principal forma de armazenamento de, 341
síntese, 340
suplementos de, 139
toxicidade, 346

vitamina D3, 216

vitamina E
antioxidante, *505*
estrutura da, *132*

vitamina K
deficiência, 80, 133
e carboxilação do glutamato, *133*
e coagulação sanguínea, 132-133
estrutura da, *133*
fontes, 133
inibidores, 133

vitaminas, 2
como coenzimas, 62
derivados, 62
e metais traço, 300
fontes de, 140
hidrossolúveis, 133-140
lipossolúveis, 129-133
suplementação na dieta de, 139-140
suplementos de, em excesso, 139, 140

V_{max}, estimada, 64

W

warfarina, 36, 78, 80

X

xantelasma, e desordem lipídica, 235

xenobióticos, 389

xilose-5-fosfato, 152

X-SCID (imunodeficiência combinada grave ligada ao X), 598

Z

zimogênios
como causa de hemofilia, 69
digestivos, 68, 117-118

zinco
absorção, 140
dedos, 452-453
deficiência, 140
tratamento oral com, 92

zona de Looser, 138

zona glomerulosa, 215, 216

zwitterions, 8, 10, 11